

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

ESTUDIOS FUNDAMENTALES SOBRE LA CAPACIDAD  
RESOLUTIVA DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN  
FASE INVERSA.

SANDRA POUS TORRES

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de setembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Elisabeth Bosch José
- Dr. Peter J. Schoenmakers
- Dra. Ana María Afonso Perera
- Dr. Samuel Carda Broch
- Dr. Guillermo Ramis Ramos

Va ser dirigida per:

Dra. Maria Celia García Álvarez-Coque

Dr. José Ramón Torres Lapasió

Dr. Juan José Baeza Baeza

©Copyright: Servei de Publicacions  
Sandra Pous Torres

---

Dipòsit legal: V-951-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7718-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAT DE QUÍMICA**

**Departament de Química Analítica**



**Estudios fundamentales  
sobre la capacidad resolutive  
de la cromatografía líquida  
en fase inversa**

MEMORIA que para alcanzar el  
GRADO de DOCTORA en QUÍMICA  
presenta la LICENCIADA  
Sandra Pous Torres

València, juliol de 2009



Dña. MARÍA CELIA GARCÍA ÁLVAREZ–COQUE, D. JUAN JOSÉ BAEZA BAEZA y D. JOSÉ RAMÓN TORRES LAPASIÓ, Catedrática de Universidad y Profesores Titulares de Universidad, respectivamente, adscritos al Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

que la presente Memoria, *“Estudios fundamentales sobre la capacidad resolutive de la cromatografía líquida en fase inversa”*, constituye la Tesis Doctoral de:

SANDRA POUS TORRES

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo, como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia, a 8 de julio de 2009.

María Celia García Álvarez–Coque

Juan José Baeza Baeza

José Ramón Torres Lapasió



Aquesta Tesi Doctoral no haguera pogut realitzar-se sense l'ajuda i el recolzament de moltes persones què directa o indirectament han contribuït a ella. És per això què en aquestes pàgines vull expressar la meua gratitud a les següents persones:

En primer lloc, als meus directors de Tesi: María Célia García Álvarez-Coque, José Ramón Torres Lapasió i Juan José Baeza Baeza, per haver-me introduït en el món de la investigació, així com per tota la seua ajuda i consells rebuts a llarg de la realització d'aquesta Tesi. La seua direcció ha donat lloc a una Tesi i a publicacions de gran qualitat. En especial, voldria donar les gràcies a Célia per la seua dedicació i els seus consells valuosos així com per la seua paciència i recolzament en els moments difícils. També voldria agrair a José Ramón el haver-me ensenyat els conceptes bàsics per utilitzar el Matlab i a entendre els algorismes de programació.

A la meua companya de laboratori, María José Ruíz, gràcies pels teus consells, per haver fet fàcil la convivència al laboratori i per tot el què m'has ensenyat al llarg dels treballs que hem fet juntes. I a Samuel, per intentar fer-me riure en els mals moments. Tots dos són grans investigadors què m'han aportat moltes coses degut a la seua experiència.

Als meus companys del Departament de Química Analítica: Dani, José Ramón, Ángel, Juan, Anna, María Jesús, Andreu i Zaca, gràcies per fer que hi haja un bon ambient al departament. Especialment vull agrair a Dani i José Ramón tots els bons moments que hem passat junts i la seua amistat. També vull donar les gràcies als companys del Departament de Química Inorgànica per les rialles durant els dinars.

Al personal d'administració del Departament, en especial a Javier per ajudar-me a resoldre tots els problemes informàtics i amb els aparells què he tingut al llarg d'aquests quatre anys. També vull donar les gràcies a María Lara, a María Mancha i a Carmen Victoria per ajudar-me a resoldre tots els temes burocràtics.

A tots aquells què em feren agradable la meua estada a Amsterdam: Filippo, Peter Pruij, Curro, Bretchje, Antonio, Gabriel, Jarek, Alessandro, Mauro, Caterina, Erwin, Stella i Yuli. Alguns d'ells em recolzaren i m'animaren molt en els mals moments i també amb ells vaig viure els millors moments de la meua estada, durant la qual vaig aprendre molt a nivell personal. A més a més vull agrair al Professor Peter Schoenmakers

el haver fet possible la meua estada al seu laboratori i el haver-me acollit com una més del grup.

Als meus companys del grup Interacció Solut-Solvent, amb els què vaig treballar durant la meua estada a la Universitat de Barcelona: Carme, Juanma, Marta, Xavi, Elham, Eli Fuguet i Eli Lázaro. Especialment a Juanma, amb qui vaig fer tot el treball realitzat allí (presentat en el Capítol 9 d'aquesta Tesi), junts aprenguérem moltes coses, va ser una formació mútua i ha estat un molt bon company de treball. També vull agrair-li la seua paciència i col·laboració en l'escriptura del Capítol 9 d'aquesta Tesi, i a ell li'l dedique. A més a més, vull agrair-li a la Professora Elisabeth Bosch el haver-me permès col·laborar al seu grup de investigació, el haver supervisat el meu treball, els consells rebuts i la seua gran humanitat.

Vull donar les gràcies al Ministeri d'Educació i Ciència per haver-me concedit la beca de Formació de Personal Investigador (FPI), gràcies a la qual he pogut iniciar-me en el món de la investigació i què ha donat com a fruit aquesta Tesi.

Per últim, però no per ser els menys importants, vull expressar la meua gratitud a tots aquells què m'han recolzat durant la realització d'aquesta Tesi fora de l'àmbit professional:

Les meues amigues: Anna, Loli, Salut, Magali, Susana, Àngela, Sara i Lorena, amb les quals he gaudit de bons i mals moments durant aquestos quatre anys, però de tots ells hem après.

Al Grup de Danses Berca, ells m'han ajudat a desconnectar de totes les tensions durant els assajos, actuacions i sopars.

La meua família, la qual encara que molts d'ells no acabaren d'entendre el què estava fent m'han recolzat. En especial a ma tia Salut, qui al ser professora, coneixia tot el què implica fer la Tesi i m'ha animat a continuar quan les forces m'abandonaven.

Raül, la parella de la meua germana, a qui tant he preocupat al llarg d'aquest últim any quan em veia trista i estressada. Gràcies per haver-te preocupat tant i per haver-me intentat animar.

Joan, la meua parella. Vull donar-li les gràcies per fer-me sentir tan especial, per recolzar-me en tots els meus plans tant professionals com personals i animar-me a seguir endavant. Però sobretot vull agrair-li la seua paciència durant aquest últim any de Tesi, ja que ell junt als meus pares i la meua germana, han sigut els què més han sofrit el meu estrés i mal humor. Gràcies per estar al meu costat.

Els meus pares, Ximo i Carme, i la meua germana Carme Maria. Ells m'han recolzat molt durant aquestos quatre anys i m'han animat a seguir endavant quan ho veia tot negre. Sense ells no hagués pogut superar els entrebancs què et posa la vida i aquesta Tesi no hagués sigut possible. A ells els dedique aquesta Tesi.

*Als meus pares, Ximo i Carme.  
A la meua germana Carme Maria.*

## Índice

<b>Objetivos y desarrollo de la Tesis Doctoral .....</b>	<b>1</b>
Objetivos y desarrollo.....	1
Comunicaciones a congresos científicos .....	4
Artículos científicos.....	6
<b>Capítulo 1. Introducción: Modelos y funciones objetivo para la optimización de la selectividad en cromatografía líquida de fase inversa .....</b>	<b>9</b>
1.1. Resumen .....	9
1.2. Optimización interpretativa .....	10
1.3. Predicción del tiempo de retención .....	13
1.3.1. Elución isocrática a pH constante .....	14
1.3.2. Elución en gradiente.....	18
1.3.3. Uso de relaciones cuantitativas estructura retención .....	21
1.3.4. El pH como factor experimental .....	23
1.3.5. La temperatura como un factor en optimización .....	28
1.3.6. Mejora en las predicciones de la retención .....	30
1.4. Predicción del perfil de pico .....	35
1.4.1. Modelización de picos cromatográficos .....	35
1.4.2. Predicción de cambios en el perfil de pico .....	40
1.5. Medida de la resolución .....	42
1.5.1. Criterios de resolución elemental.....	46
1.5.2. Criterios de resolución global .....	48
1.5.3. Pureza de pico y pureza de pico limitante.....	50
1.5.4. Obtención de tiempos cortos de análisis y otros objetivos secundarios ...	52
1.5.5. Obtención de condiciones de separación robustas .....	57
1.6. Referencias .....	58

<b>Capítulo 2. Uso de marcadores y de series homólogas en la estimación del tiempo muerto en cromatografía líquida en fase inversa</b>	<b>67</b>
2.1. Resumen	67
2.2. Introducción	68
2.3. Parte experimental	73
2.3.1. Compuestos y condiciones cromatográficas	73
2.3.2. Instrumentación y procesado de los datos	74
2.4. Tratamiento de los datos	75
2.4.1. Correlaciones entre $\log k$ y la hidrofobicidad	75
2.4.2. Método matemático de la serie homóloga	75
2.4.3. Correlación entre la retención y la composición de la fase móvil	76
2.5. Resultados y discusión	76
2.5.1. Estimación del tiempo muerto mediante el uso de marcadores	76
2.5.2. Método matemático de la serie homóloga	77
2.5.3. Correlación entre la retención y la composición de la fase móvil	83
2.6. Conclusiones	85
2.7. Referencias	86

<b>Capítulo 3. Método de regresión iterativo alternante para la estimación del tiempo muerto a partir de diseños experimentales</b>	<b>89</b>
3.1. Resumen	89
3.2. Introducción	90
3.3. Parte experimental	92
3.3.1. Compuestos de prueba y condiciones experimentales	92
3.3.2. Instrumentación y software	94
3.4. Tratamiento de los datos	95
3.5. Resultados y discusión	100
3.5.1. Nitrosaminas	101
3.5.2. Alquilbencenos	109

3.5.3. Compuestos utilizados a menudo como marcadores del tiempo muerto.....	109
3.5.4. Compuestos involucrados en un diseño experimental de optimización.....	110
3.6. Conclusiones .....	114
3.7. Referencias.....	116

## **Capítulo 4. Estimación de la capacidad de pico en elución isocrática .. 117**

4.1. Resumen.....	117
4.2. Introducción .....	118
4.3. Métodos para estimar la capacidad de pico .....	119
4.3.1. Anchuras de pico invariables: el método intuitivo .....	119
4.3.2. Eficacias de pico invariables .....	121
a)El método de Giddings .....	121
b)El método de Grushka .....	123
4.3.3. Dependencia de la eficacia con el tiempo de retención .....	123
a)El método de Grushka .....	124
b)El método de Giddings modificado para picos no gaussianos .....	127
c)El método intuitivo incluyendo cambios en la eficacia .....	130
4.4. Parte experimental .....	131
4.5. Resultados y discusión .....	132
4.5.1. Dependencia de las semianchuras de pico con el tiempo de retención .....	132
4.5.2. Simulación de cromatogramas con picos asimétricos .....	136
4.5.3. Estimación de la capacidad de pico para los cromatogramas sintéticos .....	138
4.5.4. Capacidad de pico para cromatogramas reales .....	146
4.6. Conclusiones .....	149
4.7. Referencias.....	150

<b>Capítulo 5. Efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, temperatura y pH sobre el comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables .....</b>	<b>153</b>
5.1. Resumen .....	153
5.2. Introducción .....	154
5.3. Parte experimental .....	156
5.3.1. Reactivos .....	156
5.3.2. Instrumentación.....	156
5.4. Descripción de la retención .....	157
5.4.1. Influencia del pH sobre la retención .....	157
5.4.2. La retención en función de la temperatura y el pH .....	158
5.4.3. La retención en función del contenido de disolvente orgánico y del pH .....	159
5.4.4. La retención en función del contenido de disolvente orgánico, el pH y la temperatura.....	160
5.5. Resultados y discusión .....	160
5.5.1. Consideraciones sobre el diseño experimental .....	160
5.5.2. Modelización de la retención .....	164
5.5.3. Influencia del contenido de disolvente orgánico y de la temperatura sobre las constantes de protonación .....	170
5.5.4. Consideraciones sobre la eficacia, la fuerza eluyente y la selectividad..	178
a)Eficacia .....	178
b)Fuerza eluyente .....	180
c)Selectividad .....	182
5.6. Conclusiones .....	186
5.7. Referencias .....	187



---

<b>Capítulo 6. Efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, temperatura y pH sobre el comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables: Beneficios de la optimización simultánea .....</b>	<b>189</b>
6.1. Resumen .....	189
6.2. Introducción .....	190
6.3. Parte experimental .....	196
6.3.1. Reactivos .....	196
6.3.2. Instrumentación.....	197
6.4. Tratamiento de los datos .....	197
6.4.1. Predicción de la retención .....	198
6.4.2. Predicción de los perfiles de pico .....	199
6.4.3. Predicción de la resolución .....	200
6.5. Resultados y discusión .....	201
6.5.1. Descripción del comportamiento cromatográfico .....	201
6.5.2. Diseño experimental.....	202
6.5.3. Gráficos de resolución.....	204
6.5.4. Comparación de los cromatogramas experimentales con los predichos .....	214
6.6. Conclusiones .....	217
6.7. Referencias .....	218
 <b>Capítulo 7. Optimización interpretativa del contenido de disolvente orgánico y del flujo en la separación de <math>\beta</math>-bloqueantes con una columna Chromolith RP-18e .....</b>	 <b>221</b>
7.1. Resumen .....	221
7.2. Introducción .....	222
7.3. Parte experimental .....	226
7.3.1. Reactivos .....	226
7.3.2. Instrumentación y columna .....	227
7.4. Resultados y discusión .....	227
7.4.1. Descripción del comportamiento cromatográfico.....	228

---

7.4.2. Predicción de la retención .....	231
a) Modelos de retención a flujo fijo .....	231
b) Modelo global considerando el contenido de disolvente orgánico y el flujo .....	238
7.4.3. Predicción de la forma del pico.....	240
7.4.4. Resolución .....	244
7.5. Conclusiones .....	250
7.6. Referencias .....	251

<b>Capítulo 8. Comportamiento de una columna Chromolith RP-18e en comparación con columnas de micropartículas para el análisis de <math>\beta</math>-bloqueantes .....</b>	<b>255</b>
8.1. Resumen .....	255
8.2. Introducción .....	256
8.3. Parte experimental .....	258
8.3.1. Reactivos .....	258
8.3.2. Instrumentación y columnas .....	262
8.4. Resultados y discusión .....	262
8.4.1. Columnas y compuestos de prueba .....	262
8.4.2. Modelización de la retención .....	265
8.4.3. Selectividad .....	267
8.4.4. Transferencia entre columnas .....	274
8.4.5. Perfil de pico .....	278
8.4.6. Resolución .....	283
8.5. Conclusiones .....	289
8.6. Referencias.....	290

<b>Capítulo 9. Estimación de <math>\log P_{o/w}</math> mediante un nuevo método cromatográfico</b>	<b>293</b>
9.1. Resumen	293
9.2. Introducción	294
9.2.1. El coeficiente de reparto octanol-agua: nomenclatura y aplicaciones...	295
9.2.2. Métodos para la estimación del coeficiente de reparto octanol/agua de compuestos orgánicos	296
a) Método del equilibrado de fases ( <i>shake-flask method</i> )	296
b) Determinación potenciométrica	298
c) Métodos cromatográficos para la estimación de $\log P_{o/w}$	299
c1) $\log P_{o/w}$ a partir de $\log k_w$	300
c2) $\log P_{o/w}$ mediante interpolación	303
c3) $\log P_{o/w}$ a partir de modelos de solvatación	303
c4) $\log P_{o/w}$ mediante cromatografía líquida micelar	304
c5) $\log P_{o/w}$ mediante cromatografía en contracorriente	305
d) Cálculos teóricos con programas comerciales	306
9.3. Fundamento teórico del método propuesto	306
9.3.1. El modelo de polaridad	306
9.3.2. El modelo QSPR	310
9.4. Parte experimental	313
9.4.1. Reactivos	313
9.4.2. Preparación de las fases móviles tamponadas	323
9.4.3. Instrumentación	324
9.5. Resultados y discusión	327
9.5.1. Obtención de los descriptores estructurales	327
9.5.2. Transferencia de los valores de $p$ al sistema de referencia	328
9.5.3. Estimación de $\log P_{o/w}$	332
a) Columna Luna C18	334
a1) Fases móviles de acetonitrilo-agua	335
a2) Fases móviles de metanol-agua	338
b) Columna Chromolith	341
b1) Fases móviles de acetonitrilo-agua	341
b2) Fases móviles de metanol-agua	344

9.6. Conclusiones .....	347
9.7. Referencias .....	349
<b>Conclusiones .....</b>	<b>353</b>
C.1. Estimación del tiempo muerto .....	353
C.1.1. Marcadores de tiempo muerto y método de la serie homóloga .....	353
C.1.2. Método de regresión iterativo alternante a partir de datos obtenidos de diseños experimentales .....	355
C.2. Estimación de la capacidad de pico en elución isocrática .....	357
C.3. Comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables .....	360
C.3.1. Efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, temperatura y pH .....	360
C.3.2. Beneficios de la optimización simultánea de los tres factores .....	363
C.4. Comportamiento cromatográfico de una columna Chromolith RP-18e para el análisis de $\beta$ -bloqueantes .....	365
C.4.1. Optimización interpretativa del contenido de disolvente orgánico y del flujo .....	365
C.4.2. Comparación de una columna Chromolith RP-18e con columnas de micropartículas .....	367
C.5. Estimación de $\log P_{o/w}$ mediante un nuevo método cromatográfico .....	369

**EUROPEAN DOCTORATE MENTION****Fundamental studies on the performance of reversed-phase liquid chromatography**

<b>REQUIREMENTS .....</b>	<b>E1</b>
<b>OBJECTIVES AND DEVELOPMENT OF THE RESEARCH WORK .....</b>	<b>E2</b>
Scientific communications .....	E5
Articles .....	E7
<b>SUMMARY .....</b>	<b>E10</b>
Chapter 1. Introduction .....	E10
Chapter 2. Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography .....	E12
Chapter 3. Iterative method for dead time estimation from experimental designs .....	E13
Chapter 4. Peak capacity estimation in isocratic elution .....	E15
Chapter 4. Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds .....	E16
Chapter 6. Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. Benefits of the simultaneous optimisation .....	E18
Chapter 7. Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of $\beta$ -blockers with a Chromolith RP-18e column .	E20
Chapter 8. Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of $\beta$ -blockers .....	E21
Chapter 9. Estimation of $\log P_{o/w}$ using a new chromatographic approach .....	E23

<b>UNPUBLISHED RESULTS</b>	E25
Chapter 7. Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of $\beta$ -blockers with a Chromolith RP–18e column	E25
Chapter 8. Performance of a Chromolith RP–18e column versus micromarticulate columns for the screening of $\beta$ -blockers	E55
<b>CONCLUSIONS</b>	E93
C.1. Dead time estimation	E93
C.1.1. Dead time markers and the homologous series method	E93
C.1.2. Alternating iterative method using data from experimental designs	E94
C.2. Peak capacity estimation in isocratic elution	E96
C.3. Chromatographic behaviour of ionisable compounds	E99
C.3.1. Combined effect of solvent content, temperature and pH	E99
C.3.2. Benefits of the simultaneous optimization of the three factors	E101
C.4. Chromatographic behaviour of a Chromolith RP–18e column for $\beta$ -blockers	E103
C.4.1. Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate	E103
C.4.2. Comparison of Chromolith RP–18e with microparticulate columns	E105
C.5. Estimation of $\log P_{o/w}$ using a new chromatographic approach	E107
<b>PUBLISHED ARTICLES</b>	E111

## Objetivos y desarrollo de la Tesis Doctoral

El éxito de una separación cromatográfica radica en alcanzar una interacción diferencial de los solutos con la fase estacionaria, lo que se consigue controlando los factores experimentales más accesibles. Generalmente, los requisitos para resolver cada soluto son específicos y, con frecuencia, la mejora en la separación de unos conlleva el empeoramiento en otros. Por lo tanto, lograr un compromiso que permita resolver todos los solutos en una mezcla compleja puede llegar a ser un problema arduo, que no puede abordarse mediante ensayos de prueba y error. Se ha demostrado suficientemente que el modo más eficiente de abordar una optimización en cromatografía líquida es el uso de estrategias basadas en modelos predictores de la resolución.

Los estudios de tipo fundamental son esenciales para mejorar las posibilidades de los sistemas separadores. A pesar del interés que muchos investigadores han mostrado por estos estudios, existen varios aspectos esenciales que es necesario todavía revisar o desarrollar. En esta Tesis Doctoral se han abordado algunos de ellos:

(i) *La estimación del tiempo muerto:*

“volumen de fase móvil que rellena el espacio entre el inyector y la celda del detector, lo que incluye el volumen intersticial accesible y el volumen intrapartícula de la fase estacionaria, así como el volumen extra-columnar”,

que reviste diversas y serias dificultades, no existiendo hasta la fecha un método de aceptación general para su medida. Se ha revisado la idoneidad de dos métodos muy distintos: el uso de marcadores de tiempo muerto y el método de la serie homóloga, y se ha propuesto un nuevo método que utiliza los datos de retención (a composición variable de la fase móvil) de los mismos compuestos para los que se requiere el conocimiento del tiempo muerto. Por lo tanto, considera su accesibilidad específica en la estimación.

(ii) *La estimación de la capacidad de pico:*

“número máximo de picos resueltos en una ventana de tiempo determinada”

parámetro que ha llamado la atención para evaluar el potencial de separación global de un sistema cromatográfico, especialmente en configuraciones bidimensionales.

Sin embargo, sólo es posible acceder a este concepto mediante cálculo. Se ha realizado un estudio profundo de las distintas formas de evaluar la capacidad de pico, y se han propuesto varias modificaciones que consideran picos cromatográficos reales, cuya anchura, asimetría y eficacia dependen del tiempo de retención.

- (iii) *El efecto combinado de los tres factores experimentales más importantes en cromatografía líquida (contenido de disolvente orgánico, temperatura y pH) sobre la retención de los solutos ionizables*, así como el efecto de los dos primeros factores sobre su comportamiento ácido-base. Este estudio conllevó la propuesta de un nuevo modelo de retención, que ha sido aplicado para conocer con detalle el comportamiento cromatográfico de los solutos y desarrollar una estrategia de optimización.
- (iv) *La cromatografía rápida*, utilizando una columna monolítica de base sílice y flujos elevados, para lo que se adaptó una estrategia de optimización desarrollada para cromatografía convencional, que ha permitido predecir la separación a diversas composiciones de fase móvil y flujos. El tema que, en principio, debería ser simple ya que la definición de factor de capacidad hace a este parámetro independiente del flujo, se complica por la dificultad en el control del flujo a diversas composiciones de fase móvil.
- (v) *La comparación de columnas cromatográficas*, que tradicionalmente se realiza en base a su selectividad y eficacia a una composición de fase móvil, y en todo caso, a un número reducido de composiciones. Se muestra una metodología de comparación exhaustiva en intervalos amplios de composición de la fase móvil, que considera el tiempo de análisis, la selectividad, la forma de los picos cromatográficos y la resolución, así como la posibilidad de transferir resultados entre columnas.
- (vi) *La estimación de la hidrofobicidad de compuestos orgánicos*, que hace uso de un parámetro que mide la polaridad de los solutos ( $p$ ). Se realiza la estimación del coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log P_{o/w}$ ), utilizando datos de retención para diversas columnas mediante su transferencia a un sistema de referencia, para el que la correlación entre  $p$  y  $\log P_{o/w}$  ha sido modelizada.



El trabajo aquí presentado ha supuesto un amplio desarrollo experimental, diseñado para explorar y extraer información sobre el comportamiento cromatográfico de diversos compuestos en distintas columnas y condiciones experimentales (contenido de disolvente orgánico, pH, temperatura y caudal), así como un extenso tratamiento de los datos, principalmente relacionado con la construcción de modelos para predecir la retención, la forma de los picos cromatográficos y la resolución de mezclas de compuestos, todo ello con fines de optimización de las condiciones de separación.

Se ha trabajado con compuestos de diversa naturaleza (diuréticos,  $\beta$ -bloqueantes, alquilbencenos, fenoles, entre otros muchos), eluidos con fases móviles hidro-orgánicas de acetonitrilo y metanol, utilizando columnas cromatográficas de fase inversa de diversas características. En algunos casos, en los que se necesitaba información adicional, se ha utilizado la base de datos del grupo de investigación, o datos de la bibliografía.

Debe también resaltarse el esfuerzo realizado en la revisión bibliográfica de los temas abordados, que ha supuesto la búsqueda, lectura y organización de mucha información valiosa, que en gran parte queda reflejada en cada uno de los artículos a que ha dado lugar esta Tesis Doctoral. Además, el periodo de desarrollo de la Tesis Doctoral (septiembre de 2006–septiembre de 2009) ha incluido dos estancias en otros laboratorios, concretamente en el van't Hoff Institute for Molecular Sciences de la Universidad de Ámsterdam (Holanda), bajo la dirección del Profesor Peter Schoenmakers, y en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección de la Profesora Elisabeth Bosch. La primera estancia supuso la introducción en la cromatografía bidimensional y la segunda abordó un tema de relaciones cuantitativas estructura-propiedad (*Quantitative Structure-Property Relationships*, QSPR).

Debe indicarse que debido a los trámites legales necesarios, la Memoria de Tesis Doctoral que aquí se presenta se ha terminado de preparar cinco meses antes del acto de lectura. De ahí que no hayan podido incluirse algunos trabajos de investigación que existen actualmente como un borrador de artículo o se hallan en fase experimental avanzada. A continuación, se indica la lista completa de investigaciones realizadas.

## Comunicaciones a congresos científicos

1. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, “*Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition on the chromatographic separation of ionisable compounds*”. VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Vigo, Noviembre de 2006.
2. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, “*Variation of peak shape in HPLC as a function of pH, temperature and modifier*”. VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Vigo, Noviembre de 2006.
3. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, “*Benefits of temperature to control selectivity and retention of ionisable compounds in RPLC separations*”. 31st International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2007, Gante (Bélgica), Junio de 2007.
4. W.M. Decrop, S. Pous Torres, H.J.A. Philipsen y P.J. Schoenmakers, “*Comparison of different modes of LCxLC for separating a branched polyester*”. 31st International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2007, Gante (Bélgica), Junio de 2007.
5. S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Peak capacity estimation for asymmetrical peaks following the Giddings’ approach*”. 27th International Symposium on Chromatography, Münster (Alemania), Septiembre de 2008.
6. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Reversed-phase surfactant-mediated chromatographic separations of cationic solutes*”. 27th International Symposium on Chromatography, Münster (Alemania), Septiembre de 2008.
7. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Evaluation of a monolithic column for the screening of  $\beta$ -blockers*”. 27th International Symposium on Chromatography, Münster (Alemania), Septiembre de 2008.

8. J. M. Pallicer, S. Pous Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols y E. Bosch, “*A new chromatographic method to determine the hydrophobicity of organic compounds*”. 27<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, Münster (Alemania), Septiembre de 2008.
9. J. M. Pallicer, S. Pous Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols y E. Bosch, “*Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as log  $P_{o/w}$  values through a new chromatographic method*”. Log P’2009 –PhysChem and ADMET Profiling in Drug Research. The 4th Log P Symposium, Zurich (Suiza), Febrero de 2009.
10. M.C. García Álvarez-Coque, S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió y M.J. Ruiz Ángel, “*A novel approach to estimate octanol-water partition coefficients using silica-based monolithic columns*”. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemania), Junio-Julio de 2009.
11. M.C. García Álvarez-Coque, S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió y J.J. Baeza Baeza, “*Approaches for peak capacity estimation in isocratic elution*”. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemania), Junio-Julio de 2009.
12. M.C. García Álvarez-Coque, S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel y J.R. Torres Lapasió, “*Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of  $\beta$ -blockers*”. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemania), Junio-Julio de 2009.
13. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, “*Alternating iterative regression method for dead time estimation from experimental designs*”. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemania), Junio-Julio de 2009.

14. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel y M.C. García Álvarez-Coque, “*Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of basic drugs with a Chromolith RP-18e column*”. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemania), Junio-Julio de 2009.
15. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, “*Considerations about robustness in the optimisation of the separation of ionisable compounds combining the effect of solvent content, temperature and pH*”. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Alemania), Junio-Julio de 2009.

## Artículos científicos

1. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque; “*Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds*”  
Journal of Chromatography A 1163 (2007) 49–62.
2. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, “*Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. II: Benefits of the simultaneous optimisation*”  
Journal of Chromatography A 1193 (2008) 117–128.
3. S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Peak capacity estimation in isocratic elution*”  
Journal of Chromatography A 1205 (2008) 78–89.
4. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography*”  
Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 32 (2009) 1065–1083.

5. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *“Iterative method for dead time estimation from optimisation experimental designs using alternating regression and sequential elimination of retention times”* Analytical and Bioanalytical Chemistry 394 (2009) 625–636.
6. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *“Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of  $\beta$ -blockers with a Chromolith RP-18e column”* Journal of Separation Science (en prensa).
7. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel y M.C. García Álvarez-Coque, *“Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of  $\beta$ -blockers”* Journal of Separation Science (en prensa).
8. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *“Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. III: Considerations about robustness”*.  
Enviado para su publicación.
9. J. M. Pallicer, S. Pous Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols y E. Bosch, *“New approach to determine the hydrophobicity of organic compounds based on a polarity parameter”*  
En preparación.
10. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, *“A reliable predictive tool of the resolution of ionisable compounds in RPLC”*.  
En preparación.
11. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza y M.C. García Álvarez-Coque, *“Efficiency measurement”*  
En preparación.
12. W.M. Decrop, S. Pous Torres, H.J.A. Philipsen y P.J. Schoenmakers, *“Comparison of different modes of LCxLC for separating a branched polyester”*  
En preparación

13. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Consequences of flow-rate inaccuracy in liquid chromatography*”  
En preparación.
14. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, A. Vicent Claramunt y M.C. García Álvarez-Coque, “*Reproducibility of stationary phase behaviour by addition of surfactant to the mobile phase*”  
En fase experimental.
15. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió y M.C. García Álvarez-Coque, “*Rapid analysis of phenols using ultra-high pressure liquid chromatography*”  
En fase experimental.

# Capítulo 1

## **Introducción: Modelos y funciones objetivo para la optimización de la selectividad en cromatografía líquida de fase inversa**

### **1.1. Resumen**

Las metodologías interpretativas son las herramientas más eficaces para la búsqueda de las condiciones óptimas en cromatografía. Se basan en modelos o algoritmos capaces de inferir el comportamiento de los sistemas cromatográficos al modificarse el valor de los factores experimentales. Una vez construidos los modelos con los datos obtenidos a partir de conjuntos de experiencias cuidadosamente diseñadas o de predicciones moleculares, entre otros métodos, éstos pueden aplicarse a la predicción de nuevas condiciones. En este capítulo, se describen los distintos elementos implicados en estas metodologías, considerando tanto la elución isocrática como la de gradiente. Se presta especial atención a la descripción de la retención, debido a su mayor impacto sobre la predicción de la resolución cromatográfica. Se presentan varios modelos que consideran los factores principales que afectan a la retención (i.e. concentración de los modificadores orgánicos, pH y temperatura), y la forma de mejorar las predicciones. También se considera la existencia de picos asimétricos y el efecto de las condiciones de elución sobre los perfiles de pico.

## 1.2. Optimización interpretativa

Las separaciones llevadas a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución pueden enfocarse desde dos perspectivas: la elución isocrática y la de gradiente. La elución isocrática presenta algunas ventajas, como su mayor simplicidad, menor coste y el uso de instrumentación más sencilla. Además, no es necesario efectuar el re-equilibrado de la columna entre inyecciones consecutivas. Sin embargo, su utilidad práctica queda restringida a grupos de compuestos que poseen polaridades dentro de un intervalo relativamente estrecho. Si el intervalo de polaridad es demasiado amplio, es difícil encontrar un conjunto de condiciones cromatográficas que ofrezcan una separación satisfactoria para los solutos menos retenidos y un tiempo de elución razonable para los solutos más retenidos. Una solución lógica para resolver este problema es el uso de elución en gradiente, en donde la fuerza eluyente se incrementa gradualmente alterando al menos un factor experimental durante el progreso del análisis, acelerando así la elución del compuesto más retenido.

El número de programas de gradiente que pueden ponerse en práctica es ilimitado, pero el éxito de la separación depende de manera crítica del perfil seleccionado. En la práctica, los gradientes consisten generalmente en un simple incremento lineal de un único factor experimental, pero también pueden utilizarse un conjunto de etapas isocráticas (i.e. gradiente multi-isocrático), o varios segmentos de distinta pendiente, que pueden ser lineales (i.e. gradientes multi-lineales) o curvilíneos.

Cuando un cromatografista aborda un nuevo problema, debe tomar algunas decisiones que conciernen factores no ajustables (e.g. la columna o la naturaleza del disolvente y del tampón), lo que se lleva a cabo, a menudo, tras efectuar un *screening* o en base a conocimientos previos. A continuación, examina los factores ajustables, como la concentración de disolvente orgánico, el pH, la temperatura o el programa de gradiente a través del cual se varían uno o más de estos factores. Cuando los resultados no son satisfactorios, es necesario realizar una modificación mayor del sistema cromatográfico (i.e. la columna y/o los componentes de la fase móvil). Ello se traduce en un mayor trabajo experimental, un mayor gasto económico y un retraso indeseable en el desarrollo del método. En el nuevo sistema, algunos compuestos que antes se solapaban pueden quedar ahora mejor resueltos, pero otros, que antes se hallaban bien resueltos, pueden ahora co-eluir.



Este panorama da una idea de la dificultad en la obtención de las mejores condiciones de separación cromatográfica. De ahí que se hayan propuesto diversas estrategias de optimización para asistir en la resolución de problemas complejos. A pesar de ser particularmente lento e ineficaz, el uso de estrategias de prueba y error es todavía frecuente. Muchas mezclas son, sin embargo, tan complejas que no pueden resolverse mediante estas estrategias. Afortunadamente, el desarrollo de un método puede acelerarse notablemente, consiguiéndose además resultados más fiables, mediante la aplicación de optimizaciones asistidas por ordenador. En las últimas dos décadas, han aparecido un número importante de publicaciones científicas que explican y aplican estas herramientas a diferentes muestras [1–9].

Las optimizaciones basadas en experimentos previos incluyen dos etapas: la modelización del sistema y la predicción de la resolución a través de simulaciones realizadas mediante ordenador. En la primera etapa, el cromatografista desarrolla un número de experimentos tan reducido e informativo como sea posible, con el fin de ajustar ecuaciones o entrenar algoritmos que permitan la predicción de la retención, e incidentalmente otras propiedades que caractericen un cromatograma. El propósito es desarrollar sistemas capaces de predecir la separación para cualquier condición arbitraria. En la segunda etapa, se realiza un estudio de la calidad de la separación para un gran número de condiciones cromatográficas, y se selecciona aquella condición de la que se espera proporcione la resolución máxima. En la práctica, esta etapa supone la simulación de cromatogramas para una distribución prefijada (regular o elegida de una forma arbitraria) de los factores experimentales que están siendo optimizados. Con este propósito, se construyen cromatogramas sintéticos por adición de las señales predichas para los compuestos en la mezcla analizada.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de separación, la información contenida en los cromatogramas simulados debe transformarse en un valor numérico, que es monitorizado a lo largo de la optimización. Idealmente, este valor debería correlacionarse con la apreciación del analista de la resolución alcanzada. La expresión matemática que permite la evaluación de la calidad de la separación se denomina “función objetivo”. Esta función se maximiza a lo largo del proceso de optimización. Generalmente, la función objetivo sólo considera la resolución, pero se pueden incluir

otros objetivos, más o menos subjetivos, como un tiempo de análisis más corto o perfiles de pico adecuados (i.e. eficacias elevadas y picos simétricos).

Es conveniente que el número de factores a optimizar sea tan reducido como sea posible. Muy a menudo es suficiente la optimización de un único factor para tener éxito en la separación (generalmente la concentración de disolvente orgánico en elución isocrática). La optimización de dos o más factores es menos frecuente (e.g. la concentración de disolvente orgánico y el pH o la temperatura, o la concentración de dos modificadores y el pH), debido al mayor esfuerzo experimental necesario para alcanzar predicciones exactas [10,11]. Por su parte, la elución en gradiente implica encontrar el programa de gradiente adecuado, que en términos numéricos, resulta más complicado. Los cálculos pueden llevarse a cabo de muchas formas, dependiendo de los factores seleccionados que determinen el perfil del gradiente: el tiempo del gradiente, su perfil y el valor inicial del factor/es experimental/es.

En el mercado existen varios programas informáticos que facilitan la implementación de las metodologías interpretativas, especialmente para cromatografía líquida en fase inversa (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC), que es en la actualidad el modo cromatográfico más utilizado. El desarrollo de métodos analíticos puede verse acelerado de forma notable con estos programas, y además pueden ayudar a usuarios con poca experiencia a poner a punto sus separaciones. Algunos ejemplos son los programas DRYLAB [12], PREOPT-W [13], OSIRIS [14], MICHROM [15,16], y CHROMSWORD [17].

En este capítulo, se intenta mostrar el estado actual de los conocimientos relacionados con los modelos y las funciones objetivo que se utilizan en las metodologías interpretativas de optimización en RPLC (al menos hasta el inicio de esta Tesis Doctoral). Se describen los distintos elementos implicados en éstas tanto para elución isocrática como en gradiente, y se discuten sus ventajas e inconvenientes y la forma de solucionar éstos. Se presta una atención especial a la predicción de la retención, que es el factor que afecta más profundamente a la calidad de las predicciones de resolución. Los factores experimentales estudiados son el contenido de modificador orgánico, el pH y la temperatura. Se revisan los procedimientos utilizados para mejorar las predicciones, y se considera la descripción de perfiles de pico para mejorar su fiabilidad. Se discuten

varias funciones que describen la resolución cromatográfica, así como otros objetivos secundarios que afectan a la utilidad práctica de las condiciones óptimas.

### **1.3. Predicción del tiempo de retención**

La propiedad cromatográfica que posee un mayor impacto sobre la calidad de la separación es la retención. Tal y como se ha mencionado, el primer paso en una optimización basada en experiencias previas consiste en reunir información sobre el comportamiento cromatográfico de los compuestos en la muestra analizada, cubriendo un intervalo suficientemente amplio de los factores experimentales. Esto permitirá, entre otros propósitos, la obtención de una relación que describa la retención en función de los factores experimentales, para cada soluto. La exactitud de estas predicciones es decisiva para la fiabilidad de la optimización.

Los modelos de retención para cada soluto pueden obtenerse utilizando, tanto experiencias en modo isocrático como en gradiente, mediante la búsqueda de los mejores valores de los parámetros del modelo utilizando un ajuste de mínimos cuadrados [18–20]. La expresión algebraica obtenida (un modelo empírico o mecanicista, o un algoritmo de “caja negra”) debe ser capaz de predecir los tiempos de retención isocráticos o de gradiente. La asignación de cada pico a cada soluto puede facilitarse mediante la inyección de estándares de los compuestos individuales, pero también pueden utilizarse disoluciones que contengan dos o más compuestos que exhiban tiempos de retención suficientemente distintos. Si es necesario, el reconocimiento de los picos puede realizarse variando la concentración de los estándares inyectados, o con ayuda de una técnica de detección selectiva [21–25].

La calidad de las predicciones se ve comprometida por la ecuación seleccionada para ajustar los datos de entrenamiento y por el procedimiento de ajuste. Sin embargo, también pueden ser decisivos los intervalos de los factores experimentales, la distribución de las experiencias dentro del dominio de cada factor, y el modo de elución (isocrático o gradiente) en el cual la retención y otras propiedades de los picos del conjunto de entrenamiento han sido medidas. Debe tenerse especial cuidado en el diseño de las experiencias que componen el conjunto de entrenamiento, cuando las predicciones se realizan en un modo de elución distinto (e.g. se ajusta el modelo en modo isocrático para predecir experiencias en gradiente) [26].

### 1.3.1. Elución isocrática a pH constante

Tal como se ha comentado, el contenido de disolvente orgánico en la fase móvil es el factor más frecuentemente optimizado en RPLC. Este factor no sólo tiene un gran impacto sobre la retención y la selectividad, sino que además es una propiedad muy conveniente, debido a su flexibilidad y a la precisión en su implementación; de ahí, la importancia de obtener modelos de retención fiables que consideren este factor. Se han comprobado exhaustivamente algunos modelos que permiten predicciones exactas al variar el contenido de disolvente orgánico [27–37].

El comportamiento de retención se puede modelizar con gran exactitud estableciendo una relación cuadrática entre el logaritmo del factor de retención,  $k$ , y la fracción volumétrica de disolvente orgánico en la fase móvil acuo-orgánica,  $\varphi$ :

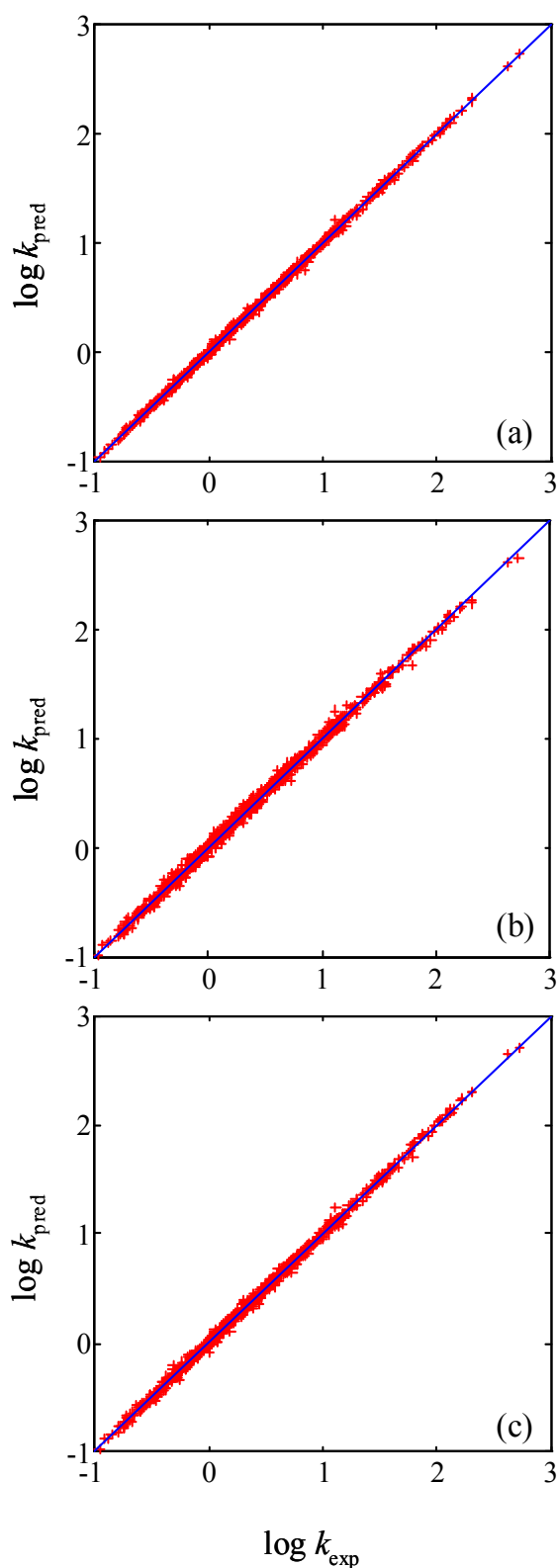
$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0} = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \varphi^2 \quad (1.1)$$

donde  $t_R$  y  $t_0$  son el tiempo de retención y el tiempo muerto, respectivamente, y  $c_i$  los coeficientes de regresión que adoptan valores característicos para un determinado soluto y sistema separador (conjunto columna/disolvente). El modelo puede simplificarse para un intervalo estrecho de contenido de disolvente orgánico a una relación lineal:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi = \log k_w - S \varphi \quad (1.2)$$

La ordenada en el origen de la línea recta ajustada se corresponde con el valor extrapolado de  $\log k$  utilizando agua como eluyente (i.e.  $\log k_w$ ) y la pendiente,  $S$ , indica la sensibilidad de la retención a cambios en el contenido de disolvente orgánico (i.e. fuerza eluyente). Las desviaciones de la linealidad son especialmente importantes a concentraciones bajas y elevadas.

Por regla general, se consiguen predicciones altamente fiables con las Ecuaciones (1.1 y 1.2) (Figura 1.1a,b), incluso cuando se hace uso de diseños experimentales mínimos con un solo grado de libertad. En muchos casos prácticos, no existen grados de libertad (aunque, en otros campos, sería estadísticamente inaceptable), basándose en el hecho de que la fiabilidad de los modelos ha sido exhaustivamente demostrada, y sólo se incluyen más experiencias en el diseño cuando se encuentran desviaciones significativas en las predicciones.



**Figura 1.1.** Exactitud, en la predicción de 752 datos de retención correspondientes a 152 compuestos eluidos con fases móviles de metanol-agua, de: (a) Ecuación (1.1) ( $r^2 = 0.9994$ ,  $SD = 0.016$ ), (b) Ecuación (1.2) ( $r^2 = 0.9974$ ,  $SD = 0.034$ ), y (c) Ecuación (1.6) ( $r^2 = 0.9986$ ,  $SD = 0.026$ ) [38].

Se hace uso de medidas realizadas en fases móviles de composición constante para predecir la retención isocrática. También resulta útil realizar una exploración inicial mediante un gradiente para ajustar los intervalos de los factores en elución isocrática a valores apropiados, o para obtener una idea aproximada de las mejores condiciones de separación [39,40].

Aunque generalmente se acepta que la Ecuación (1.2) describe de manera exacta la retención en RPLC sólo para dominios estrechos o moderados de disolvente orgánico, mientras que la Ecuación (1.1) es preferible para intervalos más amplios, generalmente el modelo se selecciona arbitrariamente (i.e. sin soporte estadístico). Esto significa que siempre existe un cierto nivel de subjetividad, por lo que las predicciones pueden resultar más o menos sesgadas. Sin embargo, se han propuesto también tests estadísticos que garantizan la ausencia de subjetividad en la selección del modelo [41–43]. Estos tests reducen el riesgo de sobreajuste (i.e. obtención de una descripción incorrecta del comportamiento del sistema, debido a la excesiva importancia concedida a los detalles de pequeña escala, en lugar de realizar un ajuste de la tendencia general del sistema). El problema del sobreajuste es particularmente importante cuando se realizan extrapolaciones, como la predicción de datos isocráticos a partir de conjuntos de entrenamiento medidos en modo gradiente.

Se ha descrito la retención en sistemas ternarios (i.e. compuestos por dos disolventes orgánicos y agua) mediante ecuaciones similares a las (1.1) y (1.2) [44–46]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi_1 + c_2 \varphi_2 + c_{12} \varphi_1 \varphi_2 + c_{11} \varphi_1^2 + c_{22} \varphi_2^2 \quad (1.3)$$

donde  $\varphi_1$  y  $\varphi_2$  son las concentraciones de los dos disolventes orgánicos en la fase móvil ternaria.

Puede obtenerse también una relación lineal adecuada correlacionando  $\log k$  con parámetros de polaridad que dependen de  $\varphi$ , como el parámetro de Dimroth-Reichardt,  $E_T(30)$ , o su valor normalizado,  $E_T^N$  [47–49]. El intervalo de linealidad es, sin embargo, limitado (e.g. 0–80% para acetonitrilo y 20–100% para metanol). Se ha propuesto un parámetro derivado de éste para extender la linealidad al intervalo completo de composiciones de fase móvil (0–100%) [38,50,51]:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13 \varphi}{1 + 1.42 \varphi} \quad (1.4)$$

para acetonitrilo, y

$$P_m^N = 1.00 - \frac{1.33\varphi}{1 + 0.47\varphi} \quad (1.5)$$

para metanol. Las predicciones de la retención se obtienen a partir de:

$$\log k = q + p_s P_m^N \quad (1.6)$$

Las Ecuaciones (1.2) y (1.6) describen modelos de dos parámetros, pero la última es válida en intervalos de concentración más amplios. De hecho, los errores de predicción con la Ecuación (1.6) son similares a los obtenidos mediante el modelo cuadrático (Ecuación (1.1)) (Figura 1.1c) [38].

Los dos parámetros de la Ecuación (1.6) ( $q$  y  $p$ ) pueden correlacionarse linealmente entre sí. Esto origina un modelo que separa las interacciones polares [50,51]:

$$\log k = (\log k)_0 + p_s (P_m^N - P_s^N) \quad (1.7)$$

Este modelo (Ecuación (1.7)) relaciona los factores de retención con descriptores de polaridad:  $p_s$  (soluto),  $P_m^N$  (fase móvil), y  $(\log k)_0$  y  $P_s^N$  (fase estacionaria). El parámetro de polaridad del soluto  $p_s$  se ha utilizado para predecir la retención ( $\log k$ ) a cualquier composición de fase móvil [38]. Aunque reúne principalmente las contribuciones del soluto, es una medida relativa que depende del sistema cromatográfico utilizado.

Una ventaja interesante de la Ecuación (1.7) es que sólo requiere el conocimiento de un parámetro por soluto y dos descriptores de la columna ( $(\log k)_0$  y  $P_s^N$ ). Esto significa que una vez caracterizada la columna, puede predecirse la retención de cualquier soluto a partir de una sola experiencia. Además, los datos de retención pueden transferirse a sistemas compuestos por otras columnas y disolventes, estableciendo correlaciones simples entre los valores de  $p_s$  para conjuntos reducidos de compuestos de referencia adecuadamente seleccionados [38]. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que las predicciones realizadas mediante la imposición de parámetros de columna comunes son más deficientes que aquéllas en las que el conjunto completo de parámetros en la ecuación se ajustan para cada soluto individualmente, lo que es preferible con propósitos de optimización.

Una estrategia de optimización interpretativa puede aplicarse siempre que se disponga de un modelo de retención suficientemente exacto. De esta forma se han

logrado excelentes predicciones en un modo de RPLC en el que la fase móvil contiene un tensioactivo en concentración por encima de su concentración micelar crítica. En este caso, se ha formulado el modelo [52,53]:

$$k = \frac{K_{AS}}{1 + K_{AM} [M]} \quad (1.8)$$

para fases móviles micelares puras, donde  $[M]$  es la concentración de las moléculas de tensioactivo implicadas en la formación de micelas, y  $K_{AS}$  y  $K_{AM}$  describen el reparto del soluto entre el agua y la fase estacionaria y la micela, respectivamente. La retención en fases móviles híbridas (i.e. que contienen tensioactivo y disolvente orgánico) viene expresada por [54]:

$$k = \frac{K_{AS} \frac{1 + K_{SD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi}}{1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} [M]} \quad (1.9)$$

donde  $K_{SD}$ ,  $K_{AD}$  y  $K_{MD}$  son constantes que consideran el desplazamiento del equilibrio de reparto debido a la adición del disolvente orgánico. La comprobación exhaustiva de estas ecuaciones ha permitido el uso de diseños mínimos con uno o incluso ningún grado de libertad para predecir las condiciones óptimas.

### **1.3.2. Elución en gradiente**

Los tiempos de retención para un soluto eluido mediante un programa de gradiente pueden describirse mediante la siguiente ecuación:

$$t_0 = \int_0^{t_g - t_0} \frac{dt}{k(\varphi(t))} \quad (1.10)$$

donde  $t_0$  es de nuevo el tiempo muerto,  $t_g$  el tiempo de retención del soluto en condiciones de gradiente, y  $k(\varphi(t))$  la ecuación que describe la retención del soluto en función del tiempo, a la composición de la fase móvil a la entrada de la columna.

Es posible calcular el tiempo de retención para cualquier gradiente, siempre que se conozca la función  $k(\varphi(t))$ . Esta dependencia implica dos ecuaciones anidadas: la variación de la concentración de disolvente orgánico con el tiempo (i.e. el programa de



gradiente), y la dependencia de  $k$  frente a  $\varphi$  (i.e. el modelo de retención). La complejidad matemática puede reducirse si se consideran los gradientes como pequeñas etapas isocráticas. Ello permite el uso de modelos que no pueden integrarse algebraicamente, incluso para gradientes lineales, o la aplicación a cualquier tipo de gradiente de modelos que pueden integrarse sólo en el caso de que los gradientes sean lineales.

Se ha aplicado las Ecuaciones (1.1), (1.2) y (1.6) a la predicción de gradientes. En las Refs. [55–61] se puede encontrar información útil sobre el uso de técnicas de optimización en elución en gradiente. Si el gradiente implica sólo cambios en  $\varphi$ , y tanto la dependencia entre  $\log k$  y el tiempo, y el programa de gradiente son lineales, la Ecuación (1.10) posee la siguiente solución algebraica [62]:

$$t_g = \frac{t_0}{b} \log (2.3 k_0 b + 1) + t_0 + t_D \quad (1.11)$$

donde  $b$  es un parámetro relacionado con la fuerza del disolvente (i.e. la pendiente del programa de gradiente,  $\varphi'$ ) y con  $t_0$  a través de:

$$b = S \varphi' t_0 \quad (1.12)$$

siendo

$$\varphi' = \frac{\Delta\varphi}{t_G} \quad (1.13)$$

donde  $\Delta\varphi$  es la diferencia entre la concentración de disolvente orgánico final e inicial, y  $t_G$  el tiempo del gradiente (i.e. el tiempo al cual se alcanza la composición final). En la Ecuación (1.11),  $t_D$  es el tiempo de retraso (i.e. *dwell time*, el tiempo necesario para que el frente del gradiente alcance la entrada de la columna), y  $k_0$  el factor de retención del soluto a la concentración inicial del gradiente. El tiempo de retraso se obtiene generalmente realizando un blanco de gradiente, en el que el contenido en acetona se incrementa desde un 0% a un pequeño porcentaje (e.g. 1%) en un tiempo arbitrario (e.g. 20 min.). Al modelizar la retención, el tiempo de retraso se implementa como una pequeña etapa isocrática al comienzo del programa de gradiente. Esto significa que los perfiles de gradiente reales deben obtenerse añadiendo el valor de  $t_D$  a los tiempos programados.

En otros casos, la ecuación integral (Ecuación (1.10)) carece de solución algebraica, y el tiempo de retención en gradiente ( $t_g$ ) debe calcularse mediante integración numérica [59,63].

La Ecuación (1.11) combinada con la Ecuación (1.1) puede resolverse algebraicamente, aunque la solución depende de la función de error [27].

Los tiempos de retención en gradiente pueden calcularse dividiendo la integral (Ecuación (1.10)) en pequeñas etapas isocráticas para hallar el último límite superior:

$$t_0 = \int_0^{t_g-t_0} \frac{dt}{k(t)} = \int_0^{t_1} \frac{dt}{k(t)} + \int_{t_1}^{t_2} \frac{dt}{k(t)} + \dots + \int_{t_{i-1}}^{t_i} \frac{dt}{k(t)} + \int_{t_i}^{t_{i+1}} \frac{dt}{k(t)} \quad (1.14)$$

Puesto que  $k(t)$  puede considerarse constante en cada una de estas etapas,  $t_0$  puede aproximarse a:

$$t_0 \approx \frac{t_1}{k_{0,1}} + \frac{t_2 - t_1}{k_{1,2}} + \dots + \frac{t_i - t_{i-1}}{k_{i-1,i}} + \frac{t_{i+1} - t_i}{k_{i,i+1}} \quad (1.15)$$

con:

$$k_{i,i+1} = \frac{k(t_i) + k(t_{i+1})}{2} \quad (1.16)$$

La precisión en  $t_g$  se puede incrementar hasta el nivel deseado, tan sólo estrechando los intervalos de tiempo ( $t_{i+1} - t_i$ ). Sin embargo, al incrementar la precisión deseada, crece el tiempo de cálculo. Además, existe una limitación asociada al sistema de bombeo, ya que los gradientes se generan por el instrumento realizando cambios en la composición en pequeñas etapas, lo que hace inútil invertir un mayor esfuerzo en obtener un cierto nivel de precisión en  $t_g$ , más allá de la capacidad del instrumento. Los incrementos de tiempo en la integración numérica deberían, así, fijarse teniendo en cuenta las especificaciones del instrumento. Habitualmente, la variación mínima en el contenido de disolvente orgánico podría hallarse próxima al 0.1%.

La predicción de la retención bajo condiciones en gradiente se realiza generalmente a partir de conjuntos de entrenamiento obtenidos a partir de experiencias en gradiente [64], pero también es posible entrecruzar la información entre ambos modos de elución: datos procedentes de experiencias en modo isocrático pueden utilizarse para predecir la retención en experiencias en gradiente, y viceversa [20].

Cuando la elución en gradiente se predice a partir de datos isocráticos, los parámetros del modelo se obtienen de forma directa, gracias a la relación explícita entre los datos de retención y los parámetros. En el caso de utilizar datos en gradiente, no existe una relación similar (i.e. ésta se debe establecer a través de una integración). La relación entre

los parámetros del modelo isocrático subyacente y los tiempos en gradiente no es lineal. De ahí que se necesite un procedimiento de regresión no lineal, aunque existen algunas excepciones, como es el caso de la teoría de la fuerza eluyente lineal (i.e. la combinación de un gradiente lineal con un modelo de retención lineal).

Se obtiene una máxima eficacia de las experiencias de entrenamiento en gradiente cuando se inyecta una disolución que contiene los estándares de todos los compuestos que se desea analizar, y se conoce inequívocamente la identidad de cada soluto. En cualquier caso, la modelización de la retención en gradiente planificada a partir de experiencias en modo isocrático convenientemente seleccionadas a menudo no sólo es más segura, sino también más rápida, puesto que no requiere la realización de etapas de re-equilibrado. Además, los datos isocráticos pueden obtenerse de la bibliografía o a partir de conjuntos de datos previos del usuario. Disponiendo de ellos, el cromatografista puede explorar la posibilidad de realizar una separación en gradiente, sin llevar a cabo experiencias en gradiente.

### 1.3.3. *Uso de relaciones cuantitativas estructura-retención*

El planteamiento ideal en un proceso de optimización supone la posibilidad de no realizar ninguna experiencia previa. De acuerdo a esta idea, se han realizado esfuerzos para estimar la retención sin ningún otro conocimiento que las estructuras químicas de los solutos cromatografiados [65–69]. Por ejemplo, de acuerdo al modelo de solvatación general, se puede correlacionar una propiedad para una serie de solutos en unas determinadas condiciones experimentales (i.e. una determinada concentración de uno o más disolventes) con los descriptores moleculares de cada soluto:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1.17)$$

donde  $SP$  puede ser la solubilidad,  $\log k$  [70,71], o el parámetro de polaridad [72], entre otras propiedades. Los descriptores son el exceso de refracción molar ( $E$ ), la dipolaridad/polarizabilidad ( $S$ ), la acidez ( $A$ ) y basicidad ( $B$ ) efectivas del enlace de hidrógeno, y el volumen característico de McGowan ( $V$ ). Cuando la Ecuación (1.17) se aplica al equilibrio de reparto entre una fase móvil y una fase estacionaria, los coeficientes  $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$  y  $v$  caracterizan las diferencias entre ambas fases. Los cuatro primeros términos son las contribuciones polares de la propiedad del soluto considerada:

$e$  es la capacidad del entorno para interaccionar con los pares de electrones  $\pi$  y  $n$  del soluto,  $s$  mide la dipolaridad/polarizabilidad del soluto,  $a$  es la basicidad del enlace de hidrógeno y  $b$  la acidez del enlace de hidrógeno. El coeficiente  $v$  considera la contribución hidrofóbica. Se encuentran disponibles descriptores para más de 4000 compuestos [73].

Se pueden establecer correlaciones útiles entre la retención (i.e.  $\log k$ ) y el coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log P_{o/w}$ ) [74–76]. Sin embargo, las columnas convencionales de RPLC poseen entre el 30–50% de sus grupos silanoles accesibles a los solutos y disolvente, incluso aquéllas que poseen un recubrimiento extenso. Estos grupos son débilmente ácidos y pueden afectar a la retención [77]. El análisis de la retención en RPLC y del coeficiente de reparto octanol/agua obtenido mediante modelos de solvatación (Ecuación (1.17)) ha mostrado que estas dos propiedades no están afectadas por los mismos descriptores del soluto. Por este motivo, la correlación entre las dos escalas lipofílicas ( $\log k$  y  $\log P_{o/w}$ ), y la conversión de una escala en la otra requiere la inclusión en el modelo de regresión de un término relacionado con la acidez [78,79]:

$$SP = c_1 + c_2 \log P_{o/w} + c_3 A \quad (1.18)$$

Hay bases de datos disponibles con un número muy elevado de valores de  $\log P_{o/w}$ , pero éste puede también predecirse y la acidez del enlace de hidrógeno puede sustituirse por otros parámetros relacionados, que pueden predecirse a partir de las estructuras moleculares.

Pueden establecerse, además, relaciones adecuadas entre los datos de retención y los descriptores moleculares con la ayuda de software capaz de calcular descriptores moleculares, tal como CODESSA [80]. Así, por ejemplo, en un estudio reciente que incluía un conjunto de 233 compuestos que mostraban una amplia variedad de características químicas, el mejor modelo contenía, además del parámetro de hidrofobicidad  $\log P_{o/w}$ , otros tres descriptores: el primero estaba relacionado con la naturaleza electrostática ( $\text{pol}/d^2$ ), el segundo era un descriptor relacionado con la energía (HOMO-LUMO), y el tercero tenía en cuenta las posibles interacciones por enlace de hidrógeno entre moléculas (HDCA–2) [68]:

$$p_s = c + p_{o/w} \log P_{o/w} + p_{o/d} (\text{pol}/d^2) + hl (\text{HOMO} - \text{LUMO}) + hd (\text{HDCA} - 2) \quad (1.19)$$

De acuerdo con estudios previos, se encontró que los descriptores que mejor explicaban los valores de  $p_s$  eran  $\log P_{o/w}$  y la acidez del enlace de hidrógeno. Desafortunadamente, hoy en día, las predicciones QSRR no son suficientemente exactas para ser utilizadas con propósitos de optimización. El elevado nivel de exactitud necesario en una optimización todavía requiere del apoyo de resultados experimentales. Sin embargo, este enfoque es interesante con propósitos prospectivos, como la selección del sistema de separación.

### 1.3.4. El pH como factor experimental

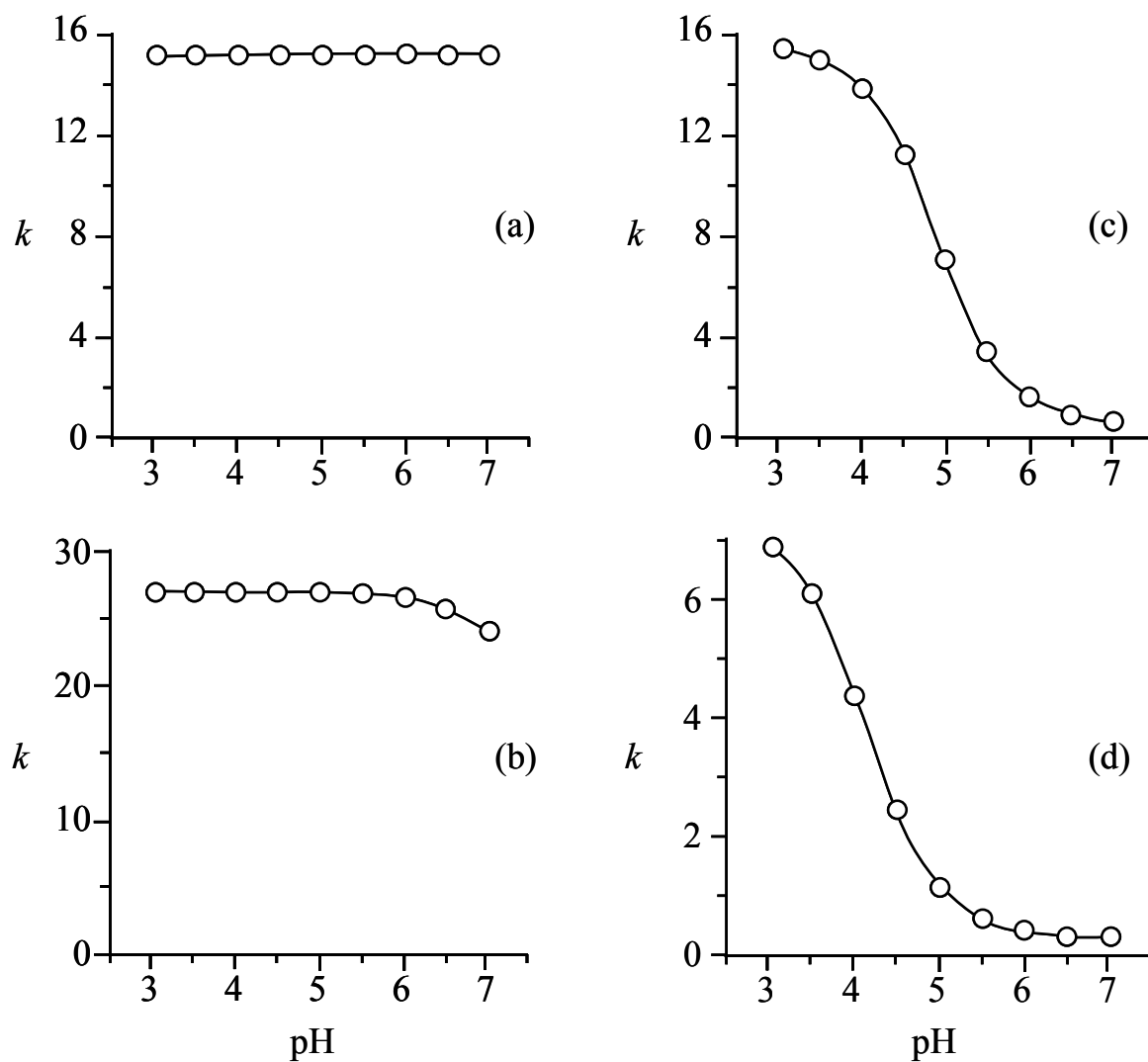
Para muchos solutos, el pH es un factor experimental adicional con una gran influencia sobre la selectividad. Cuando la mezcla analizada contiene uno o más compuestos con comportamiento ácido-base, el control de este parámetro puede ofrecer oportunidades únicas para alcanzar una buena resolución. Sin embargo, la influencia del pH sobre la retención y la selectividad es particularmente difícil de modelizar [81–93]. No es sorprendente que la práctica más ampliamente extendida sea la de fijar el pH a un valor conveniente, lo que significa que los beneficios de este factor experimental sobre la selectividad se pierden en su mayor parte.

La retención en RPLC de los compuestos ionizables es una media ponderada del comportamiento de las especies básica y ácida:

$$k = k_A \frac{1}{1 + K h} + k_{HA} \frac{K h}{1 + K h} = \frac{k_A + k_{HA} K h}{1 + K h} \quad (1.20)$$

donde  $k_A$  y  $k_{HA}$  son los respectivos factores de retención, y  $K$  la constante de protonación aparente. Como la retención intrínseca para cada especie es distinta, ocurrirá un cambio repentino en la retención a valores de pH próximos al  $\log K$  del sistema en la fase móvil (Figura 1.2). Dependiendo de la carga de ambas especies, la retención puede disminuir, aumentar o permanecer constante con el pH.

El proceso de protonación cubre varias unidades de pH y el intervalo de pH al que se produce la caída en la retención depende del  $\log K$  aparente. Sin embargo, cuando el intervalo de pH de trabajo de la fase estacionaria es estrecho (e.g. 3–7 para las columnas de RPLC convencionales), el cambio en la retención sólo puede muestrearse



**Figura 1.2.** Efecto del pH sobre la retención de: (a) amilorida, (b) triantereno, (c) triclorometiazida, y (d) bumetanida, utilizando dodecilsulfato sódico 0.05 M/4% de propanol como eluyente [94].

completamente para algunos compuestos. Por esta razón, los gráficos de retención de compuestos con comportamiento ácido-base ofrecen a menudo tan sólo una protonación parcial, lo que da lugar a diferentes situaciones. Como resultado de la información incompleta, el ajuste de los resultados experimentales puede resultar muy complicado, ya que los valores de  $k_A$  y/o  $k_{HA}$  deben obtenerse por extrapolación. Ello, obviamente, aumenta la incertidumbre en los otros parámetros del modelo [92].

Si se asume una dependencia cuadrática entre  $\log k$  y  $\log K$  frente al contenido de disolvente orgánico, se obtiene:

$$k = k_w 10^{(S\varphi + T\varphi^2)} \quad (1.21)$$

$$K = K_w 10^{(Q_1\varphi + Q_2\varphi^2)} \quad (1.22)$$

donde  $S$ ,  $T$ ,  $Q_1$  y  $Q_2$  son los coeficientes que describen la influencia del disolvente orgánico sobre  $k$  y  $K$ , y  $K_w$  es la constante de protonación en agua. La dependencia simultánea de la retención con el pH y el contenido de modificador se puede obtener sustituyendo las Ecuaciones (1.21) y (1.22) en la Ecuación (1.20) [85–87,92]:

$$k = \frac{k_{w,A} 10^{(S_A\varphi + T_A\varphi^2)}}{1 + K_w h 10^{(Q_1\varphi + Q_2\varphi^2)}} + \frac{k_{w,HA} K_w h 10^{[(S_{HA} + Q_1)\varphi + (T_{HA} + Q_2)\varphi^2]}}{1 + K_w h 10^{(Q_1\varphi + Q_2\varphi^2)}} \quad (1.23)$$

El ajuste es numéricamente más sencillo si la Ecuación (1.23) se reescribe del siguiente modo:

$$k = \frac{10^{(R_A + S_A\varphi + T_A\varphi^2)} + 10^{(R_{HA} + S_{HA}\varphi + T_{HA}\varphi^2)} h}{1 + 10^{(Q_0 + Q_1\varphi + Q_2\varphi^2)} h} \quad (1.24)$$

Las Ecuaciones (1.23) y (1.24) describen la influencia del disolvente orgánico sobre la retención. Además del conocido efecto de la disminución en el tiempo de retención, el incremento en la concentración de disolvente orgánico produce variaciones en la constante de protonación. Ello distorsiona las superficies de retención y desplaza las curvas de retención  $\log k$  vs. pH. En consecuencia, ambos factores (el contenido de disolvente orgánico y el pH) interactúan entre sí, complicando el tratamiento considerablemente.

La dependencia de la retención con el pH puede establecerse en base al modelo de polaridad (Ecuaciones (1.6) y (1.7)) [92]. Con este propósito, todos los términos en la Ecuación (1.20) deben dividirse por  $k_{HA}$ . Con ello se obtiene:

$$\log k = \log k_{HA} + \log \left[ f - \frac{K h}{1 + K h} (f - 1) \right] \quad (1.25)$$

donde

$$f = \frac{k_A}{k_{HA}} \quad (1.26)$$

Combinando las Ecuaciones. (1.7) y (1.25), y considerando una relación lineal entre  $K$  y  $\varphi$ , se llega a:

$$\log k = (\log k)_0 + p (P_m^N - P_s^N) + \log \left[ f - \frac{10^{(K'_w + m\varphi)} h}{1 + 10^{(K'_w + m\varphi)} h} (f - 1) \right] \quad (1.27)$$

Puede obtenerse una dependencia similar para RPLC micelar combinando las Ecuaciones (1.9) y (1.20) [94–97]:

$$k = \frac{\left( K_{AS} \frac{1}{1 + K_{AD} \varphi} \right) + \left( K_{HAS} \frac{1}{1 + K_{HAD} \varphi} \right) K h}{\left( 1 + K_{AM} \frac{1 + K_{MD} \varphi}{1 + K_{AD} \varphi} [M] \right) + \left( 1 + K_{HAM} \frac{1 + K_{HMD} \varphi}{1 + K_{HAD} \varphi} [M] \right) K h} \quad (1.28)$$

En la Ecuación (1.28), se ha eliminado el término  $K_{SD}$  (ver Ecuación (1.9)), que sólo es significativo para compuestos altamente hidrofóbicos (que no es el caso de los solutos protonables).

Los modelos polinómicos pueden ser también adecuados para describir la retención con una exactitud aceptable en RPLC micelar [92]:

$$\frac{1}{k} = a_0 + a_1 [M] + a_2 \varphi + a_3 \text{pH} + a_{12} [M] \varphi + a_{13} [M] \text{pH} + a_{23} \varphi \text{pH} + a_{123} [M] \varphi \text{pH} + a_{33} \text{pH}^2 \quad (1.29)$$

La validez estadística de los diferentes términos en los modelos polinómicos es más problemática y dependiente de cada soluto. La introducción de términos no significativos es perjudicial para la calidad de los ajustes, y en consecuencia, para las predicciones, especialmente cuando se llevan a cabo lejos de los puntos experimentales, aunque éstos se hallen dentro del dominio experimental.



Las Ecuaciones (1.24) y (1.29) contienen nueve parámetros ( $R_A, S_A, T_A, R_{HA}, S_{HA}, T_A, Q_0, Q_1$  y  $Q_2$  para la primera, y  $a_0, a_1, a_2, a_3, a_{12}, a_{13}, a_{23}, a_{123}$  y  $a_{33}$  para la segunda), mientras que la Ecuación (1.27) incluye sólo seis parámetros ( $(\log k)_0, P_s^N, p_s, f, K_w'$  y  $m$ ). Debido al menor número de parámetros, esta ecuación es en principio más simple, y aparentemente requiere menos experiencias. Sin embargo, la complejidad del problema (i.e. las caídas repentinas y particulares de  $\log k$  con el pH para cada soluto) recomienda la realización de un diseño experimental exhaustivo a fin de asegurar una buena descripción del espacio de los factores. Cabe destacar que el mismo diseño debe satisfacer los requisitos de ajuste de dos o más solutos. Esto significa que se necesitan más experimentos de los que se aconsejarían atendiendo al número de parámetros de la ecuación de ajuste. Así, el diseño experimental debería considerar siempre los datos provenientes de al menos 15 fases móviles (i.e. tres composiciones de fase móvil y cinco niveles de pH para cada una), con el fin de muestrear de manera apropiada un espacio cubriendo cuatro unidades de pH [92].

Existen otros problemas que deben tenerse en cuenta. Cuando la mezcla analizada es compleja y el pH se considera como un factor, las superficies de resolución pueden ser inaceptablemente poco robustas. Por ello, a menudo el pH debe ser modificado (al menos ligeramente) para conseguir una transferencia correcta de las condiciones óptimas predichas al cromatógrafo [92]. Además, las variaciones repentinas en la retención que tienen lugar para algunos solutos al cambiar el pH, permaneciendo otros inalterados, puede dar lugar a múltiples cruces de los picos cromatográficos. Finalmente, cada soluto puede requerir una región de pH distinta para lograr una buena resolución. Por consiguiente, la complejidad en la búsqueda de regiones comunes de alta resolución crece con el número de componentes en la mezcla.

Una metodología común para monitorizar el pH en RPLC consiste en medirlo en agua antes de la adición del disolvente orgánico. Esto implica el uso de tampones de referencia preparados en agua. Este procedimiento posee la ventaja de reducir el número de medidas, ya que el valor de pH será el mismo para todas las fases móviles preparadas con la misma disolución tampón, independientemente de la cantidad de disolvente orgánico. Sin embargo esta estrategia no tiene en cuenta la influencia del disolvente orgánico sobre el pH, y como resultado, las predicciones pueden diferir de manera notable de los resultados esperados.

Para realizar una medida adecuada del pH en disoluciones hidro-orgánicas es necesario tomar ciertas precauciones. En primer lugar, el tampón de referencia debe contener el mismo porcentaje de disolvente orgánico que la fase móvil; en segundo lugar, las fuerzas iónicas del tampón de referencia y de la fase móvil deben coincidir para evitar cambios en los potenciales de unión líquida; y en tercer lugar, la temperatura debe controlarse [98]. Si no se siguen estas recomendaciones, se producirán errores sistemáticos en la medida del pH. Sin embargo, pueden obtenerse valores de pH adecuados con tampones acuosos si se realizan ciertas correcciones en las medidas, que dependerán de la naturaleza del disolvente orgánico [98–100]. Por otro lado, el pH de la fase móvil puede hallarse si se conoce la dependencia de  $\log K$  con el contenido de disolvente orgánico. De este modo, se podrá calcular la concentración de base o ácido fuerte que ha de añadirse a una concentración fija de un sistema tampón disuelto en la fase móvil para obtener un determinado valor de pH [101].

A pesar de la complejidad teórica y práctica de la construcción de un modelo que considere cambios en el pH, se ha comprobado que los cromatogramas óptimos obtenidos a partir de predicciones pueden ser reproducidos experimentalmente con gran exactitud. Se han encontrado errores inferiores al 4% en la predicción de la retención utilizando los modelos citados anteriormente [92].

### **1.3.5. La temperatura como un factor en optimización**

La retención depende de la temperatura [102–104]. La influencia de la temperatura puede predecirse considerando la ecuación de Van't Hoff:

$$\log k = \frac{\Delta S}{2.3 R} - \frac{\Delta H}{2.3 RT} + \log \Phi \quad (1.30)$$

donde  $\Delta S$  y  $\Delta H$  son las variaciones entrópicas y entálpicas del sistema, respectivamente,  $T$  es la temperatura absoluta,  $R$  la constante universal de los gases, y  $\Phi$  la relación de fases en el sistema. Un modo más conveniente de expresar esta relación es:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} \quad (1.31)$$

que es válida para intervalos de hasta 90°C en RPLC [105]. Para intervalos más amplios,

los gráficos son curvilíneos, y se necesita un tercer término [103]:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} + \frac{c_2}{T^2} \quad (1.32)$$

La utilidad de la temperatura como factor para mejorar las separaciones cromatográficas es bastante polémica [105]. Puesto que la difusión de los solutos se incrementa colateralmente con la temperatura, un incremento en este factor reduce los tiempos de retención, pero se empobrece la resolución en menor o mayor medida. Sin embargo, algunos autores han descrito incrementos en la eficacia cromatográfica [104], que originaría mejoras en la resolución. Por otro lado, la pendiente de la ecuación de Van't Hoff para diferentes solutos puede ser suficientemente distinta como para afectar a la selectividad de manera significativa, produciendo de manera ocasional el entrecruzamiento de picos al variar la temperatura. Los cambios en la selectividad aparentemente son mayores para compuestos ionizables o polares [105,106]. Además, son particularmente intensos para moléculas grandes, como las proteínas, que pueden exhibir diversas conformaciones dependiendo de la temperatura [107].

Los efectos de la fuerza eluyente y de la temperatura sobre la selectividad son aproximadamente ortogonales entre sí [105]. Por lo tanto, picos difíciles de resolver mediante la optimización de la fuerza eluyente, pueden separarse optimizando la temperatura [105,108–110]. Aunque no influye, generalmente, sobre la selectividad de la misma forma que el contenido de disolvente orgánico, la pendiente del gradiente, el tipo de disolvente y el pH, la temperatura puede ser un potente factor complementario en la optimización [105]. Incluso en los casos donde el impacto de la temperatura sobre la selectividad sea inapreciable, la reducción en el tiempo de análisis es un motivo importante para considerar este factor [103], una vez que se ha optimizado la selectividad.

### **1.3.6. Mejora en la predicción de la retención**

En la práctica cromatográfica, las medidas replicadas de tiempos de retención a una cierta composición de fase móvil siempre fluctúan dentro de un intervalo. Las razones posibles son las irregularidades en el caudal de la bomba y la inyección de la muestra, las fluctuaciones en la temperatura y en el suministro eléctrico, la degradación de la fase estacionaria, y los errores en la preparación de la fase móvil (i.e. desviaciones de la composición nominal o pérdidas incontroladas del disolvente orgánico), entre otras. Estas fuentes de error pueden deteriorar la calidad de las predicciones [111].

El proceso de regresión construye la mejor relación posible entre la respuesta y los predictores [30,33,41–43]. Esto se realiza minimizando la suma de los cuadrados de los residuales (i.e. el cuadrado de la diferencia entre la respuesta real y la predicha, extendido a todo el conjunto de datos experimentales). Sin embargo, cuando la respuesta se transforma para alcanzar una relación lineal más conveniente (e.g. la transformación logarítmica en las Ecuaciones (1.1) y (1.2)), el conjunto de parámetros (de regresión) óptimos minimizarán los residuales para la respuesta transformada ( $\log k$ ), pero no para la original ( $k$ ) [112], que es la que nos interesa en realidad.

Cuando se aplica una regresión lineal por mínimos cuadrados no ponderada, se produce una distribución de errores homocedástica: las respuestas se predicen con un error absoluto uniforme. Cuando se lleva a cabo una transformación, la regresión lineal no ponderada también producirá una distribución de error homocedástica, pero para la respuesta transformada. En consecuencia, la distribución de error para la respuesta original dejará de ser uniforme. Como la influencia relativa en el ajuste de los datos de gran magnitud disminuye, las predicciones empeoran. De este modo, cuando la retención cubre más de dos órdenes de magnitud, las desviaciones entre los factores de retención experimentales y predichos obtenidos mediante la regresión no ponderada pueden sobrepasar las 10 unidades para los compuestos altamente retenidos. Para intervalos más estrechos, se obtiene también una distribución de error heterocedástica, pero en menor medida [113].

La transformación logarítmica convierte una fracción del error aleatorio en sistemático. Puede compensarse la desviación del ajuste mediante la aplicación de pesos (Figura 1.3), que se pueden obtener aplicando la teoría de errores [113]:

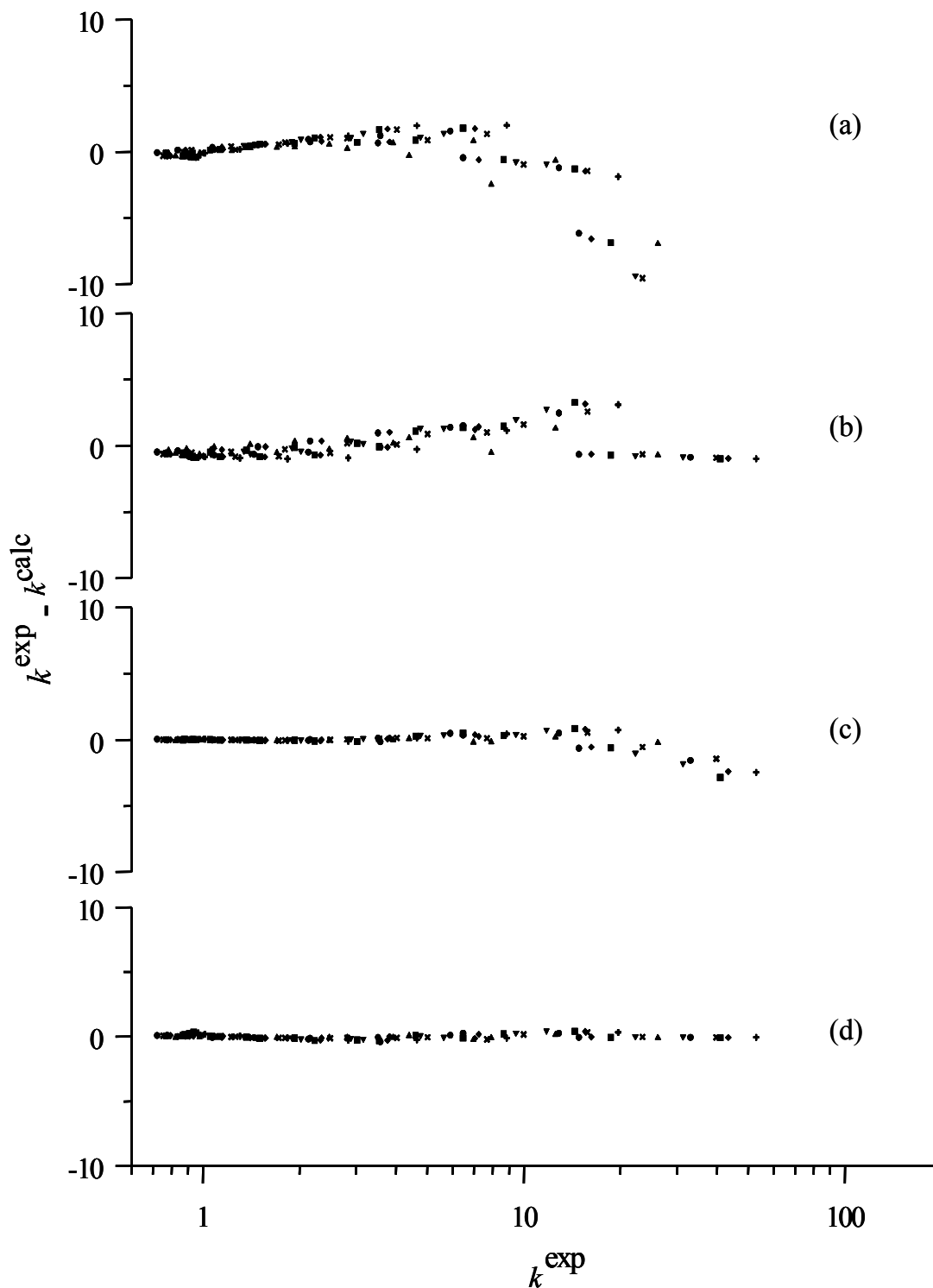
$$w = \left( \frac{\partial F}{\partial f} \right)^2 = \frac{1}{\left( \frac{\partial \log k}{\partial k} \right)^2} = (2.303 k)^2 \quad (1.33)$$

donde  $F$  y  $f$  son las ecuaciones no lineales y lineales, respectivamente.

La regresión lineal ponderada no sólo soluciona el problema de la correlación entre la respuesta y los errores, consiguiendo los mismos resultados que los procedimientos no lineales, sino que además los ajustes pueden llevarse a cabo sin la necesidad de realizar iteraciones. Se recomienda el uso de pesos como norma general, debido a la gran probabilidad de conseguir una buena resolución para contenidos de modificador intermedios y bajos. La regresión ponderada, sin embargo, empobrece la exactitud para eluyentes más rápidos. Por lo tanto, si ocasionalmente se predice una condición óptima con un eluyente rápido, las predicciones deberían repetirse utilizando regresión no ponderada.

Se han sugerido otras estrategias para mejorar las predicciones. La solución más simple es la mejora *a posteriori* del modelo de retención [109,114–116]. Esta corrección supone la adición de datos obtenidos a partir de nuevas experiencias en las condiciones óptimas predichas, con lo que se consigue mejorar la exactitud en la zona del óptimo.

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, un caso en el que la fiabilidad de las predicciones es particularmente crítica es el análisis de mezclas que incluyen compuestos básicos y/o ácidos, debido a los cambios repentinos en la fuerza eluyente a un pH próximo a los valores de  $\log K$ . Para estos compuestos, se producen fuertes variaciones en la retención, mientras que la retención no varía para aquellos compuestos que no son afectados por el pH. Esto da lugar al entrecruzamiento de picos. Una buena solución para incrementar la fiabilidad en estos casos consiste en comparar los cromatogramas experimentales y predichos, y alterar prudentemente el pH en la fase móvil hasta hacer coincidir el cromatograma experimental con el esperado [92,115]. La idea es encontrar una condición próxima que dé lugar a un cromatograma que coincida con el experimental. Una vez conocida esta composición, se realiza un nuevo experimento introduciendo la corrección pertinente.



**Figura 1.3.** Exactitud en la predicción de los factores de retención para 13 fenoles, de acuerdo a la Ecuación (1.2) (a,c) y a la Ecuación (1.1) (b,d) realizando un ajuste no ponderado (a,b) y ponderado (c,d) de los factores de retención experimentales obtenidos en nueve fases móviles conteniendo acetonitrilo en el intervalo 20–100% [113].

Supóngase que se predice un óptimo a pH 9.5 y el cromatograma experimental a este pH muestra una resolución pobre. Pues bien, a continuación se realizarían simulaciones alrededor del óptimo teórico. Supóngase ahora que el cromatograma simulado que coincide con el experimental se obtiene a pH 9.7, entonces, se esperaría que una nueva experiencia realizada a pH 9.3 coincidiera con la óptima teórica.

Los errores asociados a la preparación de la fase móvil pueden compensarse utilizando compuestos de referencia, que deberían estar presentes en cada inyección de la muestra [117]. Estos compuestos se utilizan como estándares internos con el propósito de corregir no la concentración de los solutos, sino la composición de la fase móvil. Puede tratarse de compuestos no incluidos en la muestra, añadidos deliberadamente a la disolución inyectada, un reactivo utilizado en una derivatización pre-columna, o sub-productos de dicha derivatización. El procedimiento consta de tres etapas. En la primera etapa se construyen los modelos que relacionan  $\log k$  con el contenido de modificador en la fase móvil para cada pico de referencia, usando para ello el tiempo de retención promedio para cada fase móvil ensayada (debe llamarse la atención sobre el hecho de que el diseño experimental proporciona un gran número de valores de tiempo de retención para cada pico de referencia obtenido para cada composición de fase móvil). A continuación, los modelos ajustados se aplican a los tiempos de retención particulares de los picos de referencia en cada inyección de la muestra, a fin de conseguir las composiciones correctas. Finalmente, estas composiciones se utilizan para modelizar el comportamiento de retención del analito. La diferencia respecto del ajuste convencional es que, en los modelos, se utiliza el contenido de modificador corregido, no el nominal. Este planteamiento es especialmente útil para situaciones donde el desarrollo del diseño experimental requiere varios días. El método aprovecha el incremento en la precisión proporcionada por el gran número de réplicas disponibles para los compuestos de referencia. Esta precisión se transfiere parcialmente a las medidas llevadas a cabo para los analitos, para los cuales sólo se dispone de un número reducido de réplicas. Sin embargo, no existe garantía de que los cambios observados en los tiempos de retención de los estándares se deban exclusivamente a los errores en la composición de la fase móvil.

En algunos casos, el modo de elución de los datos utilizados para modelizar la retención difiere del modo en el que se deben realizar las predicciones. Existen cuatro posibilidades, ya que los tiempos de retención isocráticos o de gradiente se pueden predecir a partir de conjuntos de entrenamiento obtenidos en modo isocrático o en modo

gradiente [19,20]. Para las experiencias en gradiente, existe siempre un modelo isocrático subyacente que relaciona la retención con la composición. Se ha demostrado que la Ecuación (1.1) describe adecuadamente intervalos amplios de concentración de disolvente orgánico en predicciones de isocrático a isocrático y de isocrático a gradiente, en contraposición con los resultados que ofrece la Ecuación (1.2), que da lugar a predicciones insatisfactorias. La situación para las predicciones de gradiente a gradiente es completamente diferente: ambos modelos de retención dan resultados de la misma calidad. Esto puede explicarse considerando la naturaleza de la información necesaria para predecir los tiempos de retención en gradiente: la elución en gradiente implica dominios de disolvente orgánico más estrechos que la elución en modo isocrático [26]. Esto también justifica los pobres resultados obtenidos en las predicciones de gradiente a isocrático, que requiere la realización de extrapolaciones. Las experiencias isocráticas son considerablemente más ricas en información.

La migración de un soluto sometido a elución en gradiente se halla afectada por una fracción de concentraciones bastante estrecha controlada por el programa de gradiente. El soluto empieza a migrar de forma significativa una vez se alcanza una cierta concentración de modificador, y puede abandonar la columna antes de que se complete el gradiente. Puede inferirse que los gradientes proporcionarán predicciones aceptables de datos isocráticos para ambos modelos lineal y cuadrático tan sólo en un intervalo estrecho de concentraciones. Fuera de él, las predicciones se hallarán sesgadas. A este intervalo de concentración, se le ha denominado intervalo informativo del disolvente (*solvent informative range*, SIR), que es el dominio de concentraciones donde la información (extraída a partir de las experiencias en gradiente) es significativa [26].

Basándose en el concepto de SIR, se ha desarrollado una metodología para mejorar las predicciones en gradientes lineales utilizando conjuntos de entrenamiento isocráticos, cuando se realizan utilizando el modelo lineal (Ecuación (1.2)) [26]. Este planteamiento calcula pesos que dan mayor importancia a las concentraciones de disolvente que son significativas para las predicciones deseadas (i.e. el SIR). El modelo lineal posee la ventaja de permitir la predicción de gradientes lineales sin integración numérica. Esto es útil en situaciones que requieren cálculos masivos, como la optimización de condiciones de gradiente. Tras ponderar los ajustes realizados con el modelo lineal (que sólo es válido para intervalos de concentración de disolvente orgánico relativamente estrechos) utilizando datos isocráticos, los resultados se hacen comparables a los obtenidos a partir



de medidas experimentales realizadas en gradiente. El método representa una alternativa a ecuaciones que no presentan solución algebraica, con un ahorro considerable en el tiempo de cálculo.

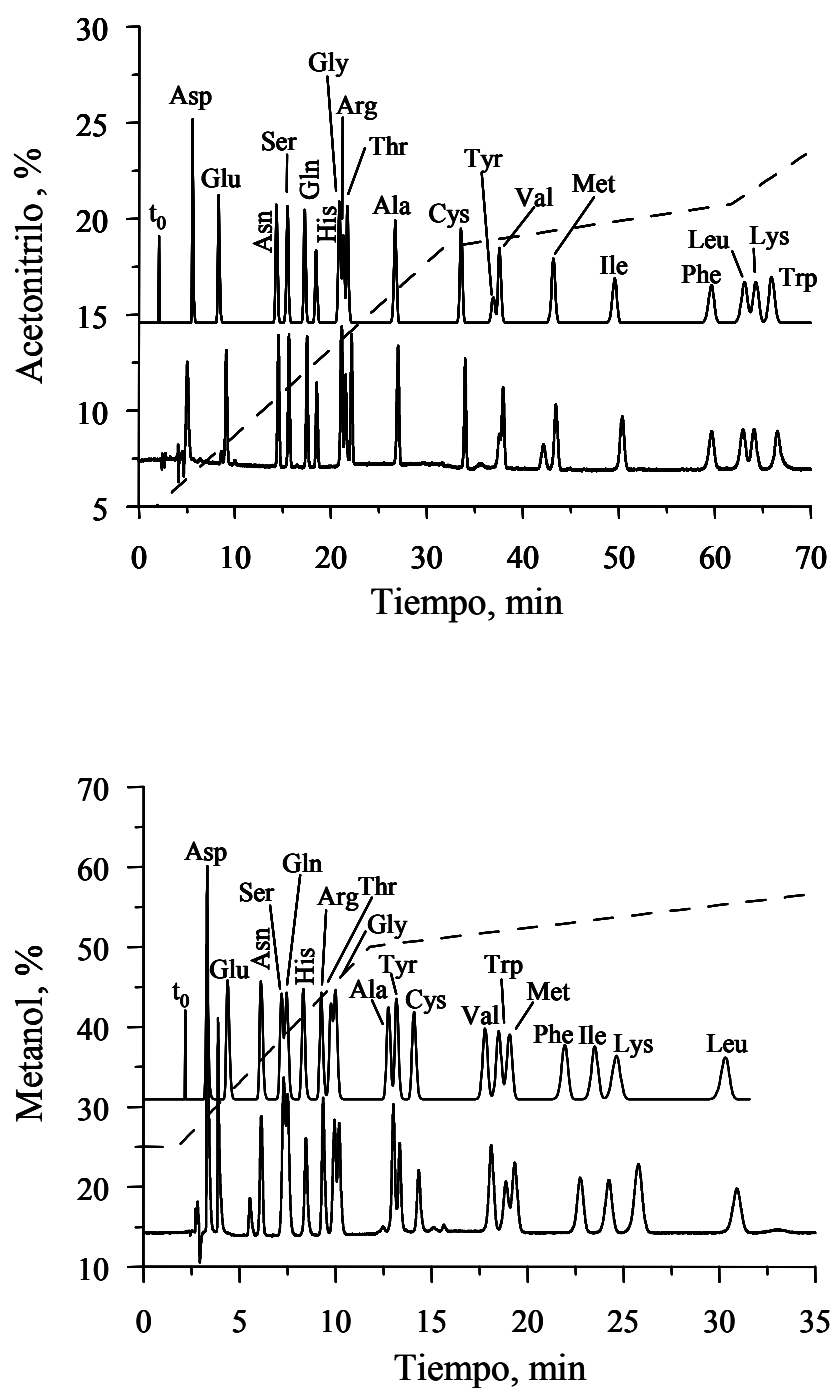
## **1.4. Predicción del perfil de pico**

### **1.4.1. Modelización de picos cromatográficos**

Muy a menudo, la optimización de la resolución (Sección 1.5) se lleva a cabo utilizando información de cromatogramas simplificados, donde sólo se consideran los tiempos de retención. Este tratamiento está sustentado por la idea de que la propiedad más relevante del pico es la retención. Sin embargo, las simulaciones realistas de cromatogramas requieren tratamientos más elaborados, que consideren la anchura de las bandas o incluso el perfil completo de los picos (Figura 1.4). En algunos casos, se deben considerar también las áreas de los picos individuales a fin de conseguir una optimización fiable (e.g. para tener en cuenta un compuesto minoritario), aunque en la mayoría de los casos, es válido adoptar áreas normalizadas, ya que proporcionan una solución general.

Para el cálculo de la resolución, los criterios más completos requieren la simulación de cromatogramas, que se construyen mediante la adición de picos individuales. Existen otros criterios menos informativos donde esto no es esencial. Sin embargo, la posibilidad de simular cromatogramas posee el interés de permitir la evaluación de la calidad de las predicciones por comparación con los correspondientes cromatogramas experimentales.

Se han propuesto un gran número de funciones matemáticas teóricas y empíricas para describir perfiles de picos cromatográficos, que resuelven el problema con distinto éxito [118–122]. Los perfiles de elución de picos cromatográficos simétricos y no sobresaturados se describen adecuadamente mediante el modelo gaussiano. Los picos no ideales (exhibiendo sesgos positivos o negativos) son, sin embargo, bastante comunes en la práctica. Además, la descripción del perfil de los picos asimétricos debería considerar su variación con la composición de la fase móvil y otros factores [123]. De ahí que se necesite un modelo matemático adecuado y sencillo que permita simular cada pico en un cromatograma. El modelo debería considerar propiedades fácilmente medibles (i.e. el tiempo de retención, la eficacia, la asimetría, y el área o la altura de los picos).



**Figura 1.4.** Cromatogramas predichos (cromatogramas superiores) y experimentales (cromatogramas inferiores) para programas de gradiente óptimos en la separación de aminoácidos proteicos primarios derivatizados con *o*-ftaldehído.

Una ecuación que cumple estos requisitos consiste en una modificación del modelo gaussiano, en la que la desviación estándar varía con la distancia al máximo del pico, ecuación que ha sido denominada modelo gaussiano polinomialmente modificado (PMG) [119,120]. En su formulación inicial, este modelo fue expresado como:

$$h(t) = h_0 \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R) + s_2 (t - t_R)^2 + \dots} \right)^2 \right] \quad (1.34)$$

donde  $h(t)$  y  $h_0$  son la altura al tiempo  $t$  y la altura en el máximo del pico, respectivamente,  $t_R$  es el tiempo de retención del soluto,  $s_0$  una medida de la anchura del pico considerándolo gaussiano (i.e. un pico gaussiano que se comporta como el asimétrico en las proximidades de su máximo), y  $s_1$  y los términos de mayor orden consideran la distorsión del pico. La ecuación representa, en realidad, una familia de modelos, puesto que los cambios en el grado del polinomio en el término de la desviación estándar dan lugar a diversas funciones. Cuanto mayor es el grado del polinomio, más flexible es el modelo (Ecuación 1.34) y mayores las probabilidades de ajuste de los datos experimentales. Teóricamente, no hay un límite en el grado del polinomio, pero en la práctica, las funciones parabólicas o cúbicas son suficientes para ajustar la mayoría de las señales cromatográficas, sin producirse subajuste o sobreajuste significativo.

El cromatograma de una muestra puede contener un gran número de picos que deben modelizarse o ser predichos individualmente. De ahí que en el campo de la optimización, lo más conveniente es utilizar un modelo PMG con un término de desviación estándar lineal (i.e. incluyendo sólo los términos  $s_0$  y  $s_1$ ). La ventaja de este modelo, además de su simplicidad, es la facilidad para relacionar sus cuatro parámetros ( $s_0$ ,  $s_1$ ,  $h_0$  y  $t_R$ ) con cuatro propiedades del pico fácilmente medibles: el tiempo de retención, la eficacia, la asimetría y el área o altura. Si se calcula la eficacia ( $N$ ) de acuerdo con la ecuación propuesta por Foley y Dorsey [124],  $s_0$  y  $s_1$  pueden calcularse como:

$$s_0 = 0.466 \sqrt{\frac{41.7 t_R^2}{N (1.25 + f_{B/A})}} \left( 1 - \frac{f_{B/A} - 1}{f_{B/A} + 1} \right) \quad (1.35)$$

$$s_1 = 0.466 \frac{f_{B/A} - 1}{f_{B/A} + 1} \quad (1.36)$$

donde  $f_{B/A}$  es el factor de asimetría medido al 10% de la altura del pico, que se obtiene dividiendo las semianchuras posterior ( $B$ ) y frontal ( $A$ ) del pico.

El modelo PMG puede ajustar casi cualquier pico, pero predice incrementos de la línea base fuera de la región del pico [120]. Esto es especialmente problemático en el campo de la optimización, donde se deben sumar las señales de picos individuales para obtener las señales compuestas. Con este fin, para evitar artefactos, debe restablecerse la línea base a ambos lados del pico. Los artefactos son más intensos en señales fuertemente asimétricas ( $f_{B/A} > 2.5$ ) y en las simulaciones que impliquen ventanas de tiempo amplias. Inicialmente, se solucionó este problema ajustando la altura a cada lado de la región del pico a su respectivo valor mínimo [119]. Se han sugerido, alternativamente, otras ecuaciones de pico [120–122]. Una de estas ecuaciones es una función gaussiana modificada con una varianza parabólica [121] (Figura 1.5):

$$h(t) = h_0 \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{(t - t_R)^2}{s_0^2 + a(t - t_R) + b(t - t_R)^2} \right] \quad (1.37)$$

donde

$$a = \frac{B - A}{B A} s_0^2 \quad (1.38)$$

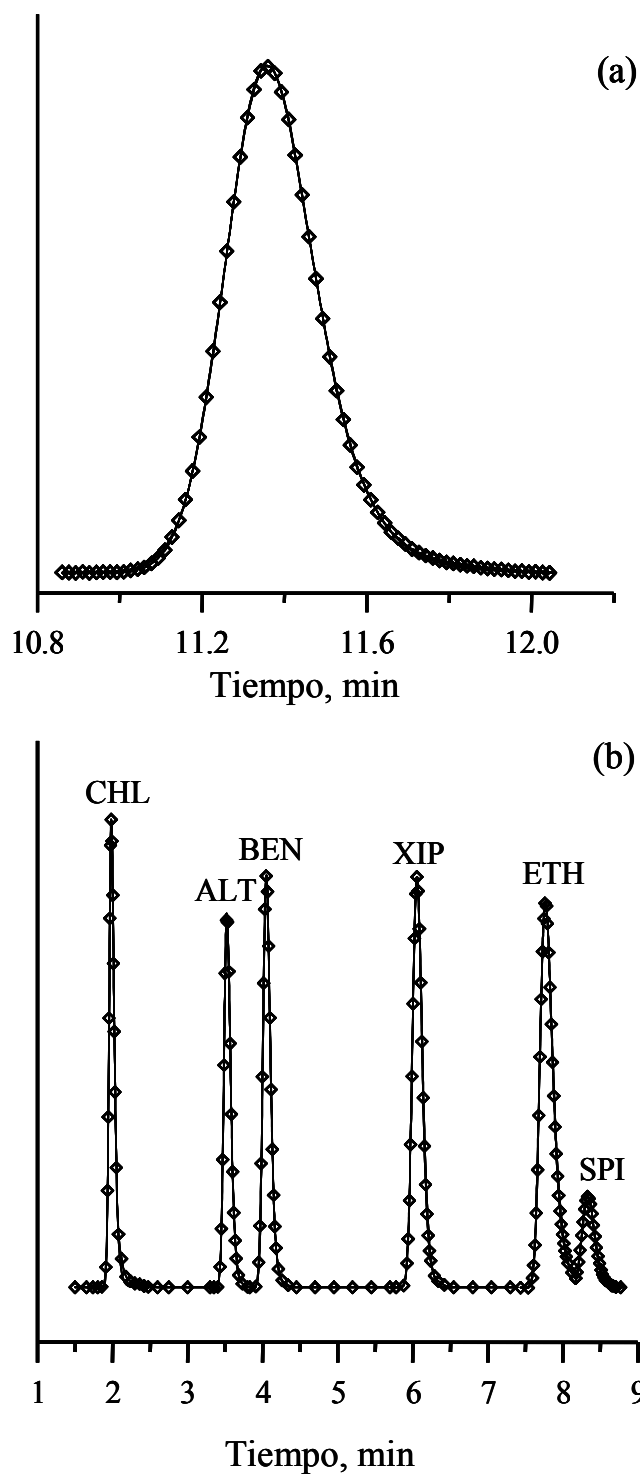
$$b = 1 - \frac{s_0^2}{B A} \quad (1.39)$$

Otra solución práctica es el uso de una función mixta exponencial-PMG, que se obtiene mediante la adición de dos caídas exponenciales a ambos lados del pico PMG al 10% de altura, sujeto a la restricción de que las pendientes de la gaussiana y las funciones exponenciales coincidan en los respectivos puntos de conexión [122]. Las caídas exponenciales vienen dadas por:

$$\begin{cases} h = c_{1,izquierda} \exp \{c_{2,izquierda} (t - t_R)\} & \text{for } t < t_R - A \\ h = c_{1,derecha} \exp \{c_{2,derecha} (t - t_R)\} & \text{for } t > t_R + B \end{cases} \quad (1.40)$$

donde la semianchura frontal,  $A$ , se calcula como:

$$A = \sqrt{\frac{41.7 t_R^2}{N (1.25 + f_{B/A})}} \frac{1}{1 + f_{B/A}} \quad (1.41)$$



**Figura 1.5.** Picos cromatográficos experimentales ( $\diamond$ ) y ajustados utilizando una función gaussiana modificada con una varianza parabólica (línea sólida) para: (a) xipamida eluída con 40% de acetonitrilo a pH 4, y (b) una mezcla de clortalidona (CHL), altiazida (ALT), benzotiazida (BEN), xipamida (XIP), ácido etacrínico (ETH), y espironolactona (SPI) eluídos con 50% de acetonitrilo a pH 3 [125].

y la semianchura posterior,  $B$ , se obtiene multiplicando  $A$  por el factor de asimetría. Los parámetros para ambas caídas vienen dados por:

$$c_{2,izquierda} = \frac{s_0 A}{(s_0 - s_1 A)^3} \quad (1.42)$$

$$c_{1,izquierda} = 0.1 h_0 \exp(c_{2,izquierda} A) \quad (1.43)$$

$$c_{2,derecha} = -\frac{s_0 B}{(s_0 + s_1 B)^3} \quad (1.44)$$

$$c_{1,derecha} = 0.1 h_0 \exp(c_{2,derecha} B) \quad (1.45)$$

Este enfoque ha mejorado las simulaciones de picos cromatográficos asimétricos [122], y señales electroforéticas extremadamente distorsionadas [126], obteniéndose resultados altamente satisfactorios. A pesar de la complejidad aparente, la implementación de todas estas funciones en un lenguaje de programación es sencillo, y es notable el grado de realismo que confiere al sistema de optimización.

### **1.4.2. Predicción de cambios en el perfil de pico**

Los perfiles de pico son el resultado de los procesos de adsorción/desorción que tienen lugar en el interior de la columna y de los efectos extra-columnares. Los primeros se ven afectados por la naturaleza química del soluto. Entre los factores experimentales que alteran los perfiles de pico se hallan la concentración de disolvente orgánico, el pH y la fuerza iónica. La eficacia y la asimetría del pico resumen la anchura relativa del pico y su deformación. Por lo tanto, cabe esperar que su predicción, junto con el tiempo de retención y el área del pico, conduzca a predicciones correctas de los picos cromatográficos en un proceso de optimización.

Los modelos propuestos para la predicción de  $N$  y  $f_{B/A}$  son menos precisos que los que se utilizan para anticipar la retención [127]. A pesar de su menor exactitud, se conseguirán mejores predicciones considerando variaciones limitadas de  $N$  y  $f_{B/A}$  con la composición de la fase móvil para cada soluto, respecto al uso de un valor común de  $N$  y  $f_{B/A}$  para todos los solutos y fases móviles, o incluso valores promedio particulares para cada soluto en el espacio de los factores considerado [109].

Pueden utilizarse modelos locales o globales para predecir los parámetros relacionados con el perfil de pico. Los modelos locales consideran las variaciones en los alrededores del punto predicho, utilizando los resultados experimentales obtenidos para las fases móviles disponibles más cercanas a la predicha [59,113], mientras que los modelos globales están dirigidos a modelizar la tendencia global del conjunto de entrenamiento. La predicción de las eficacias y asimetrías puede realizarse de manera sencilla mediante una interpolación lineal.

Si puede establecerse una correlación adecuada entre el tiempo de retención (que puede ser predicho con gran exactitud) y los parámetros que caracterizan el perfil de pico (e.g.  $A$  y  $B$ , y  $s_0$  en las Ecuaciones (1.34) y (1.37)), éstos también podrán ser predichos con suficiente exactitud [125]. Se ha encontrado que dicha correlación es parabólica (casi lineal). Además, todos los compuestos eluidos en una determinada columna de RPLC siguen una tendencia similar en la variación de su perfil de pico con el tiempo de retención. Por lo tanto, las columnas pueden caracterizarse utilizando los parámetros del perfil de pico para unos pocos compuestos eluidos a diversos tiempos de retención.

En la optimización de gradientes, se obtienen predicciones satisfactorias del perfil de pico aplicando el planteamiento de Jandera [59,128]. Éste afirma que la anchura del pico para un determinado soluto es aproximadamente igual a la observada a la composición de fase móvil que afecta al soluto cuando éste alcanza la salida de la columna durante el gradiente. El mismo planteamiento se ha propuesto para la predicción de la asimetría del pico [59]. Las predicciones realizadas mediante el planteamiento de Jandera tienden a ser pesimistas, ya que los picos en los cromatogramas reales obtenidos con gradientes usuales, son siempre más simétricos que los predichos. Ello conduce, sin embargo, a condiciones óptimas conservadoras, lo que es deseable. En cualquier caso, las predicciones de gradientes se ven beneficiadas por los desarrollos en el campo de la modelización de la forma del pico en condiciones isocráticas.

La predicción de la forma del pico en elución en gradiente se lleva a cabo en dos etapas [59]. En la primera, los modelos para  $N$  y  $f_{B/A}$  se construyen en función de la composición de la fase móvil. Para las predicciones de isocrático a gradiente, esto es directo, ya que el conjunto de entrenamiento incluye resultados isocráticos. Para las predicciones de gradiente a gradiente, se construyen modelos secundarios isocráticos relacionando  $N$  y  $f_{B/A}$  con la composición instantánea del gradiente (medida a la salida de

la columna). En la segunda etapa, se usan los modelos isocráticos ajustados para  $N$  y  $f_{B/A}$  para predecir las formas de los picos en gradiente. Para ello, se calcula la concentración de disolvente orgánico cuando el soluto deja la columna, para un determinado gradiente, y los correspondientes valores de  $N$  y  $f_{B/A}$  se interpolan para cada soluto. Con el fin de conseguir predicciones satisfactorias, el tiempo de retención del soluto eluido isocráticamente para la concentración de disolvente orgánico calculada se utiliza para evaluar  $s_0$  en las Ecuaciones (1.35) y (1.37).

### 1.5. Medida de la resolución

El objetivo de la optimización interpretativa basada en datos experimentales es establecer las condiciones para alcanzar la máxima resolución, usando los datos procedentes de un conjunto de experiencias tan reducido e informativo como sea posible. El proceso implica medir la calidad de cientos de cromatogramas generados mediante ordenador. Los cromatogramas pueden abarcar desde sólo la localización de los picos para los criterios de resolución más simples, hasta simulaciones exhaustivas de la señal frente al tiempo. Cada uno de estos cromatogramas corresponde a un conjunto particular de factores experimentales, que se ajustan adecuadamente a lo largo del proceso de optimización. La inspección de la información proporcionada por los cromatogramas puede llevarse a cabo visualmente, lo que es ineficaz y consume mucho tiempo. El examen puede ser más exhaustivo, riguroso y práctico si se realiza asistido de una función objetivo cromatográfica (*chromatographic objective function*, COF), que es una expresión matemática que califica el nivel de resolución asociado a cada distribución de picos [2,8,44,85,123,129–139]. La COF puede incluir criterios de calidad adicionales, como el coste del análisis, la retención del primer y último pico, y el número de picos resueltos. Sin embargo, debido a que siempre prevalece la resolución como criterio de separación, con frecuencia la COF sólo considera esta propiedad.

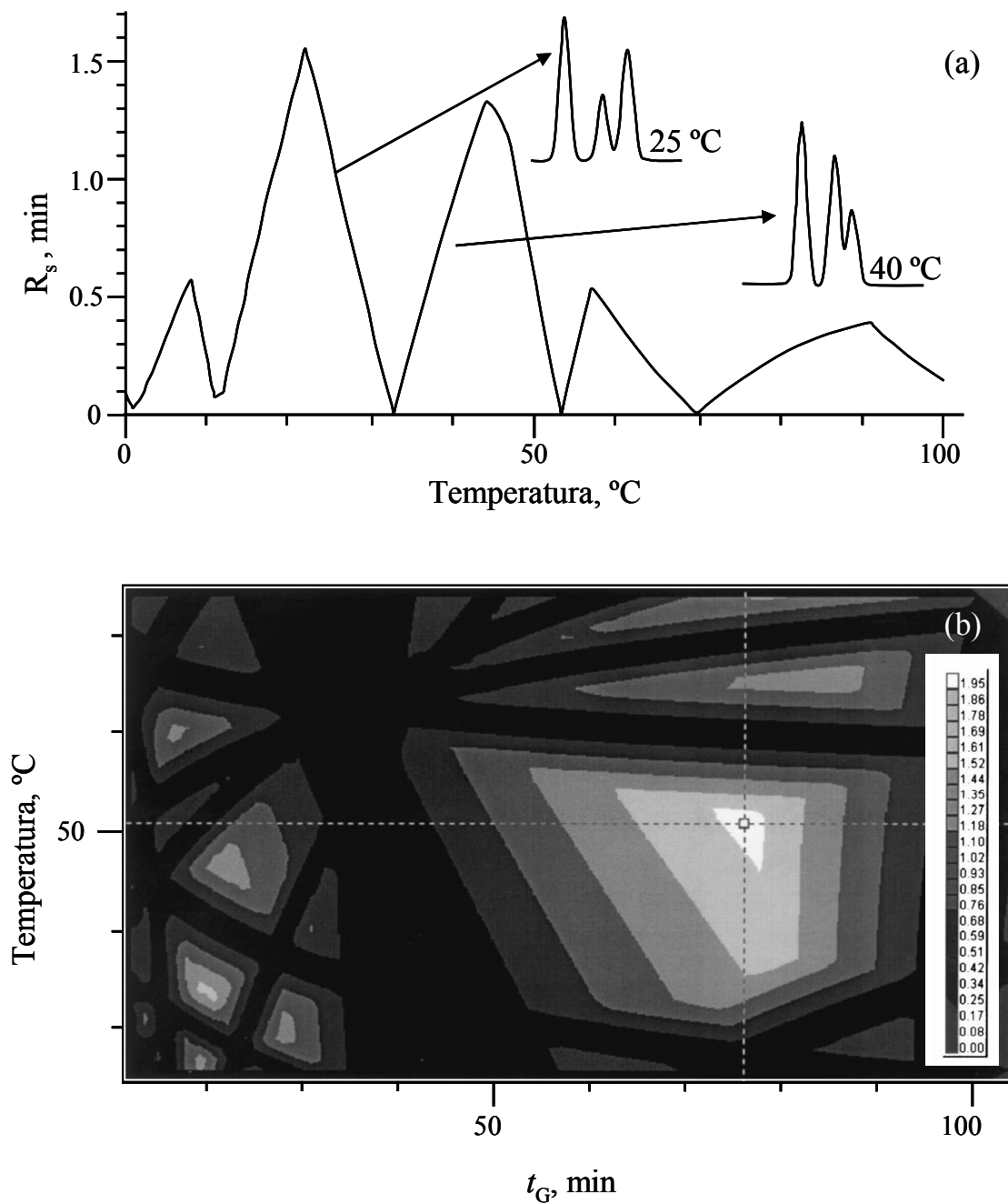
El valor máximo de la COF indica las mejores condiciones de separación. Su validez está, sin embargo, asociada a la posibilidad de evaluar los cromatogramas como haría un cromatografista experto. Realmente, la fiabilidad de un proceso de optimización depende de dos factores. El primero es que los cromatogramas simulados deben ser realistas. Como ya se ha indicado, las simulaciones se han beneficiado de los progresos en la



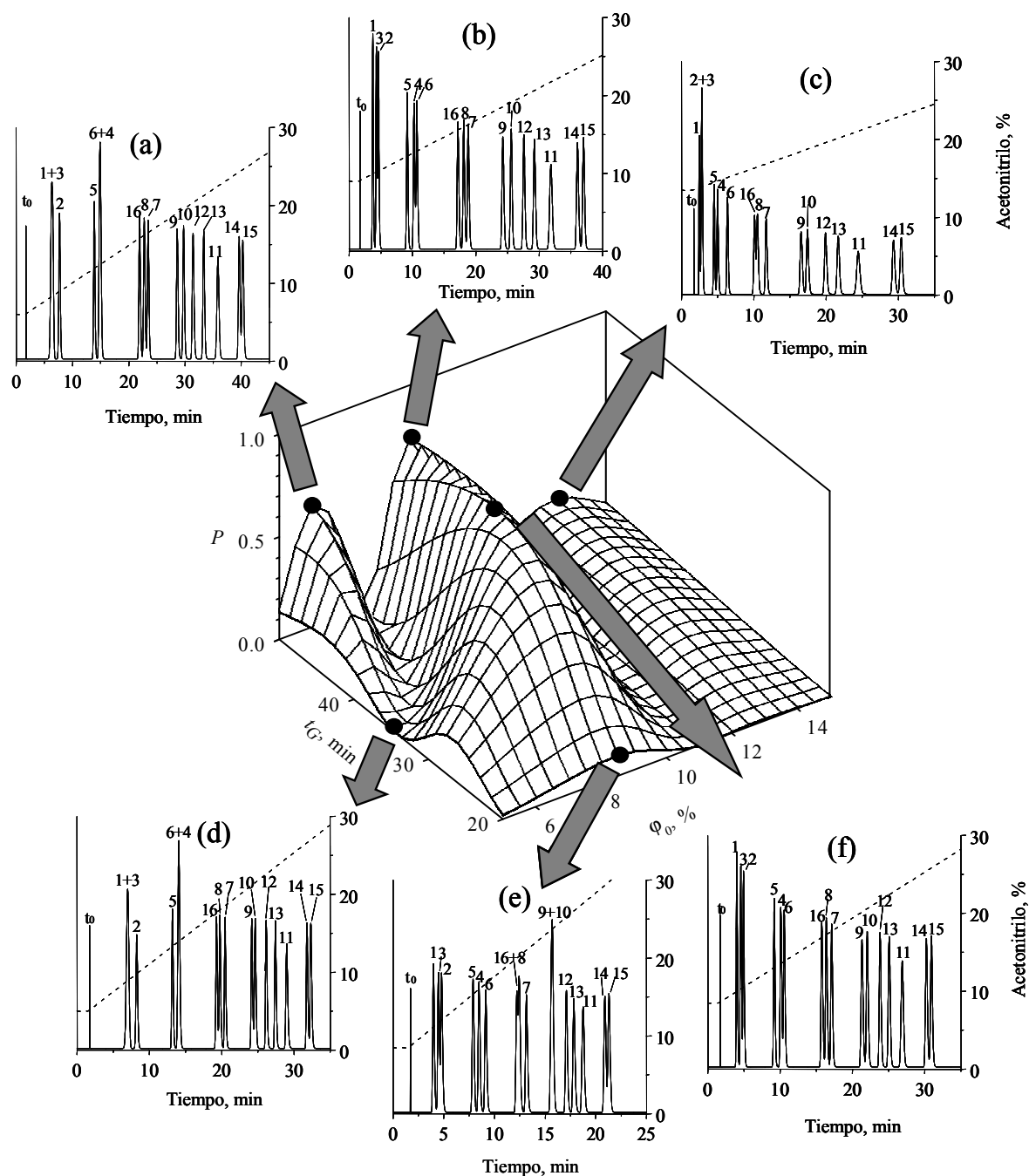
modelización del tiempo de retención y de la forma de pico. El segundo factor es que el criterio de resolución seleccionado cuantifique la resolución del pico de manera adecuada. Esto es particularmente importante para los picos asimétricos o cuando el área de los picos individuales difiere de manera significativa. Desafortunadamente, la validez de las condiciones óptimas proporcionadas por un procedimiento interpretativo, viene determinada por la elección de la COF.

El analista estima la calidad de un cromatograma considerando, en primer lugar, la separación individual de cada pico. En la siguiente etapa, se examina la distribución global de los picos. Este proceso puede ser imitado numéricamente calculando un conjunto de valores de resolución elementales para cada soluto particular o par de solutos, que se combinan a continuación mediante una función de reducción para obtener un único valor numérico. El cálculo se lleva a cabo para un conjunto de condiciones predefinidas incluidas dentro del diseño experimental. Las resoluciones calculadas ordenadas en matrices pueden visualizarse como diagramas de ventana (Figura 1.6a) o mapas de resolución (Figuras 1.6b y 1.7). La función de reducción debería cuantificar el grado de separación adecuadamente, diferenciar distribuciones de picos aparentemente similares, y conducir a una identificación clara de las condiciones de separación que ofrezcan la mejor resolución.

El proceso requiere el cálculo de funciones intermedias (e.g. para  $k$ ,  $N$  y  $f_{B/A}$  frente a la composición de fase móvil) para evaluar la resolución. Es también posible realizar la modelización directa de la resolución frente a la composición de fase móvil, normalmente a través de relaciones polinómicas [140,141]. Este último planteamiento es adecuado cuando no se producen inversiones del orden de elución de los picos, aunque éstos pueden procesarse de forma iterativa.



**Figura 1.6.** (a) Diagrama de ventana para una mezcla de aditivos alimentarios [105], y (b) mapa de contornos de resolución para una mezcla de 15 estándares toxicológicos en función de la temperatura y el tiempo de gradiente [109]. Ambos diagramas se dibujaron considerando el valor de  $R_s$  para los picos peor resueltos.



**Figura 1.7.** Diagrama de pureza de pico global para la optimización del tiempo de gradiente y concentración inicial de acetonitrilo en la separación de 16  $\beta$ -bloqueantes. Se muestran también los cromatogramas para algunos puntos del diagrama. Las líneas punteadas sobre los cromatogramas representan los programas de gradiente [59].

### 1.5.1. Criterios de resolución elemental

Las resoluciones elementales califican la separación particular de cada soluto respecto del resto de picos en el cromatograma, o entre cada par de picos consecutivos. Se han propuesto medidas de diversa complejidad para este propósito. La más simple, que considera tan sólo la posición del pico, es la selectividad:

$$\alpha_{i,i+1} = \frac{k_{i,i+1}}{k_i} \quad (1.46)$$

donde  $k_i$  y  $k_{i+1}$  (con  $k_{i+1} > k_i$ ) son los factores de retención de dos picos consecutivos. Este criterio proporciona un único valor para cada par de picos. Sin embargo, puesto que no se considera la anchura del pico, la selectividad sólo es adecuada para comparar cromatogramas donde los picos son relativamente estrechos considerando la distancia entre picos.

Otros criterios de resolución elemental consideran las anchuras de los picos individuales e incluso los perfiles de los picos y su tamaño. Estos criterios son interesantes no sólo cuando se aplican a picos asimétricos o de baja eficacia, sino también en situaciones donde la separación entre picos es pequeña, o cuando se trata de una impureza. La así llamada resolución cromatográfica,  $R_S$ , es ciertamente el criterio más conocido:

$$R_S = \frac{t_{R,i+1} - t_{R,i}}{B_i + A_{i+1}} \quad (1.47)$$

donde  $t_{R,i+1}$  y  $t_{R,i}$  son los tiempos de retención de dos picos consecutivos y  $B_i$  y  $A_{i+1}$ , su semianchura de cola y frontal, respectivamente. Generalmente, se toma como valor umbral de separación de la línea base un valor de  $R_S = 2.5$ , pero este valor sólo es apropiado para picos gaussianos. Se han propuesto modificaciones del parámetro  $R_S$  que consideran las anchuras de los picos, las asimetrías o la relación de alturas [123].

También pueden aplicarse diferentes tipos de relaciones valle-pico, tal como la modificación ortogonal de la relación clásica valle-pico [137]. Este cálculo se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, se halla un punto del cromatograma denominado el punto del valle, buscando la distancia máxima ortogonal a partir de la línea de unión entre los máximos de dos picos consecutivos al cromatograma. En la segunda etapa, se aplica la siguiente ecuación:

$$v_{i,i+1} = 1 - \frac{h_1}{h_2} \quad (1.48)$$

donde  $h_1$  representa la altura de la señal y  $h_2$  la altura de la línea de unión, ambas en el tiempo del punto del valle. Esta definición evita las caídas a cero cuando el pico de menor altura aparece como un hombro del pico principal. Si el valle se observa ortogonalmente, este punto será evidente.

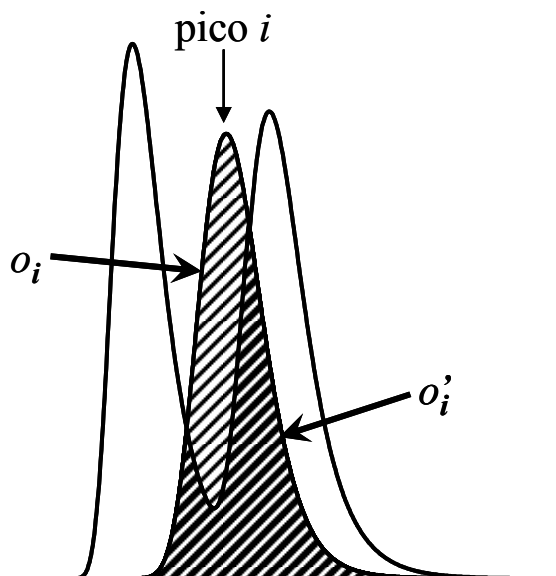
Otra COF elemental es la pureza de pico, que es el complemento de la fracción solapada [9,134,137]. Esta medida cuantifica el porcentaje del área del pico libre de interferencias:

$$p_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (1.49)$$

donde  $o_i'$  es el área bajo el pico solapado por un cromatograma hipotético construido con los picos de los compuestos acompañantes en la muestra estudiada, y  $o_i$  es el área total del pico de interés (Figura 1.8). Esta medida varía desde cero cuando el solapamiento es completo, a uno cuando la resolución es total, y depende del área relativa de los picos. Tiempo atrás se había propuesto utilizar la fracción de pico solapado, que es una medida similar [2], aunque apenas se utilizó, ya que requiere conocer la posición y el perfil de cada pico en el cromatograma. De hecho, el cálculo de la pureza de pico es laborioso, y sólo es posible mediante cálculo numérico. Sin embargo, ofrece ventajas únicas. Afortunadamente, los ordenadores actuales y la propuesta de modelos de pico más prácticos han reavivado el interés por este cálculo. Otros criterios que poseen la misma limitación, aunque con ventajas similares, son las representaciones vectoriales de cromatogramas, que hoy en día son completamente viables con el desarrollo de ordenadores más rápidos [142].

Los cromatogramas seleccionados como óptimos por diferentes COFs pueden diferir de manera significativa, y el cromatografista puede encontrar unos considerablemente mejores que otros. Ello muestra la diversa habilidad de estas funciones para dirigir la búsqueda, aunque el espacio de los factores explorado sea el mismo [131,134,135]. La razón es que las COFs son demasiado simples para considerar todas las características que el cromatografista tiene en cuenta en su evaluación de la calidad. Entre las funciones publicadas, la pureza de pico se correlaciona particularmente bien con la apreciación de

un analista experto, incluso cuando los picos son muy asimétricos y se hallan solapados [119,137].



**Figura 1.8.** Criterio de pureza de pico: solapamiento del pico  $i$  con dos interferencias.

### 1.5.2. Criterio de resolución global

Tal y como se ha comentado, la evaluación de la separación global en un cromatograma se realiza reduciendo las resoluciones elementales ( $r_i$ ) a un valor único que describe en conjunto la distribución de los picos en un cromatograma ( $R$ ) [2,131,134]. La función de reducción utilizada mayoritariamente, debido a su simplicidad, consiste en encontrar la peor resolución elemental, es decir, el par de picos peor resuelto (el denominado par crítico):

$$R = \min (r_i) \quad 1 \leq i \leq n \quad (1.50)$$

En otros casos, el objetivo de la optimización se extiende a más picos, aparte del par crítico, lo que se realiza combinando sus resoluciones elementales de una forma más o menos compleja. Dos criterios ampliamente utilizados son el producto de resolución normalizado por la media:

$$R = \frac{\prod_{i=1}^n r_i}{\left[ \left( \sum_{i=1}^n r_i \right) / n \right]^n} \quad (1.51)$$

y el producto de resolución no normalizado:

$$R = \prod_{i=1}^n r_i \quad (1.52)$$

donde  $n$  representa, dependiendo del criterio elemental, el número de picos (e.g. en el criterio de la pureza de pico) o de pares de picos (e.g. en los criterios de selectividad y  $R_S$ ). Con los valores elementales normalizados, las tres funciones globales (Ecuaciones (1.50)–(1.52)) varían entre 0 (cuando al menos un pico se halla totalmente solapado) y 1 (cuando todos los picos están resueltos hasta la línea base). Cuanto más cerca de la unidad, mejor es la separación. Los productos de las resoluciones elementales tienden a hallarse dominados por los picos pobremente resueltos, lo que significa que una optimización basada en estos productos descarta rápidamente condiciones donde dos o más picos quedan sin resolver. La situación es incluso peor con las medidas no normalizadas, particularmente cuando los resultados deben ser interpretados.

Por otro lado, una optimización basada en la separación del pico peor resuelto es razonable, pero sólo atiende a los resultados para el pico o par de picos críticos. Por lo tanto, es insensible a la separación alcanzada por los demás picos en el cromatograma. Así, cromatogramas a los que se asocia un mismo valor de resolución pueden mostrar diferencias importantes en la separación de los picos no críticos. Por esta razón, es preferible utilizar un criterio combinado que tenga en cuenta todos los picos en un cromatograma.

La optimización de nuevas muestras está orientada en un primer momento a encontrar una única condición de separación, capaz de resolver todos los picos en un cromatograma. Si esto no es posible, el problema se puede reconsiderar con objetivos menos ambiciosos, centrándose en tan sólo algunos solutos. En un caso extremo, se optimiza un único soluto. Las estrategias de optimización actuales satisfacen los diferentes objetivos perseguidos en el análisis [9].

### **1.5.3. Pureza de pico y pureza de pico limitante**

Se ha comentado que la pureza de pico garantiza la calidad de los resultados en una optimización. Esta medida posee ventajas interesantes en comparación con el clásico  $R_s$ . En primer lugar, su significado es muy intuitivo: un valor de pureza de pico de 0.95 significa que el 95% del pico se halla libre de interferencias (o sólo se ve interferido en un 5%). Por consiguiente, se relaciona con lo que el cromatografista desea: picos libres de interferencias. También, este criterio considera no sólo la posición del pico sino también su perfil y tamaño. Por lo tanto, los diagramas de resolución correspondientes proporcionan un panorama más realista de la capacidad separativa del sistema. Finalmente, la pureza de pico es una medida intrínsecamente normalizada, que facilita la combinación de resoluciones elementales en un único valor global, y eventualmente, la combinación con otros criterios de calidad.

Sin embargo, tal vez, la característica del concepto de pureza de pico con más consecuencias, al menos a nivel de cálculo, es que proporciona la calidad de la separación para cada pico individual, en lugar de para cada par de picos. Por lo tanto, existe una relación inequívoca entre las identidades de los compuestos y los valores numéricos, y de ahí que el conocimiento de la identidad de los picos vecinos no sea tan importante como para otros criterios referidos a pares de picos (e.g.  $R_s$ ). Además, algunas operaciones, como la ponderación o la exclusión de picos, son más sencillas, y se evitan los problemas relacionados con el entrecruzamiento de picos: cualquier otro pico en el cromatograma se considera como interferente.

Quizás la medida más útil derivada del concepto de pureza de pico es la llamada “pureza de pico limitante” ( $p_{lim}$ ): el valor elemental máximo encontrado para cada compuesto. Las purezas limitantes miden la máxima expectativa de resolución para cada compuesto, lo que conlleva interesantes aplicaciones [63,143,144]. El significado de pureza limitante es el mismo que para la pureza convencional: si un soluto se resuelve en su totalidad, la pureza limitante será la unidad. Cuando existe un cierto solapamiento con uno o varios solutos, su valor será  $<1$ . Si el valor limitante es pequeño, ninguna fase móvil resolverá el soluto. Ello significa que la capacidad del sistema ha sido explotada en su totalidad, y cualquier posible mejora requeriría un cambio drástico en el sistema separador.



El grado en el que se explota la capacidad separativa para un compuesto particular,  $j$ , en un cierto sistema cromatográfico, a una determinada condición experimental  $i^{\text{th}}$ , viene dado por [144]:

$$p_{\text{rel}}(i, j) = \frac{p(i, j)}{p_{\text{lim}}(j)} \times 100 \quad (1.53)$$

Por su parte, la pureza de pico limitante combinada ( $P_{\text{lim}}$ ) explora la capacidad del sistema cromatográfico. El significado es similar al de resolución global: indica la máxima capacidad separadora que puede alcanzarse para un conjunto de compuestos. El porcentaje de resolución global informa sobre el grado de explotación del sistema separador:

$$P_{\text{rel}}(i) = \frac{P(i)}{P_{\text{lim}}} \times 100 \quad (1.54)$$

Cuando  $P_{\text{rel}}$  se halla cercana al 100%, no se puede esperar ninguna mejora significativa variando las condiciones de separación. Sin embargo, la interpretación del porcentaje de resolución global es menos evidente que para los valores elementales, y debería realizarse con precaución, ya que incluye otros efectos que influyen sobre los valores numéricos, como el número de picos y la distribución de las purezas individuales.

El concepto de pureza de pico ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de optimización [9]. Por un lado, el hecho de que se pueda anticipar la máxima capacidad resolutoria del sistema separador es particularmente útil para abordar situaciones de baja resolución, donde los criterios de resolución convencionales fallan [145]. Por otro lado, permite la optimización simultánea de dos o más fases móviles, eluyentes y/o columnas, o incluso técnicas separativas (optimizaciones complementarias) [143,144,146], aunque otras estimaciones de la resolución podrían ser igualmente válidas, a condición de que se sean capaces de asociar un único valor a cada soluto.

La elución isocrática proporciona la máxima capacidad del sistema, ya que expande al máximo la separación entre picos. Sin embargo, puede implicar tiempos de análisis impracticables para mezclas complejas, lo que obliga al uso de gradientes de elución. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que al incrementarse la complejidad del gradiente aplicado, las purezas limitantes tienden a los valores que se obtendrían en elución isocrática. Si las purezas limitantes isocráticas indican que uno o más pares no pueden separarse hasta la línea base, ningún gradiente podrá lograr la separación.

La  $R_S$  clásica (que se ha llamado “factor de separación” o incluso, “resolución”) presenta algunas limitaciones. Es un criterio que no proporciona medidas normalizadas, lo que restringe las posibilidades de combinación de valores elementales, y hace más difícil su interpretación. Este parámetro crece indefinidamente con la separación entre picos, incluso tras quedar perfectamente resueltos los picos hasta la línea base y sea inútil una separación mayor. Ello obliga a introducir umbrales que dependen de la asimetría del pico, y en consecuencia, el uso de pesos o truncamientos en la función para establecer cuándo se ha alcanzado la separación hasta la línea base, y no se necesita un nivel de resolución superior.

Debe tenerse en cuenta que el criterio  $R_S$  concierne a pares de picos, en lugar de picos individuales, lo que implica una fuerte restricción cuando el objetivo no es la separación de todos los componentes en la muestra, sino la resolución de sólo alguno o algunos de ellos. Por otro lado, la asignación de valores es problemática cuando el orden de elución se altera con la composición de la fase móvil. Además, un cambio en la identidad de los componentes del par de picos crítico introduce variaciones artificiales súbitas en los diagramas de resolución, lo que genera sesgos en la evaluación de la robustez. Finalmente, las resoluciones limitantes sólo poseen sentido con criterios de resolución asociados a picos individuales, como la pureza de pico. Éstas y otras desventajas pueden superarse parcialmente, pero las soluciones son innecesariamente complejas y no del todo satisfactorias.

#### ***1.5.4. Obtención de tiempos cortos de análisis y otros objetivos secundarios***

En las optimizaciones reales, debe sacrificarse algo de resolución para satisfacer otros requisitos secundarios [147]. Por ejemplo, en las condiciones óptimas, el compuesto que eluye en último lugar puede hallarse excesivamente retenido, la robustez puede ser deficiente, el coste del análisis excesivo, el método puede ser inapropiado medio-ambientalmente, o la cuantificación de los picos difícil debido a una asimetría excesiva. Ello puede obligar a descartar la separación óptima y elegir otras condiciones en su lugar, que a pesar de ofrecer una menor resolución, sean más adecuadas de acuerdo a los criterios secundarios.

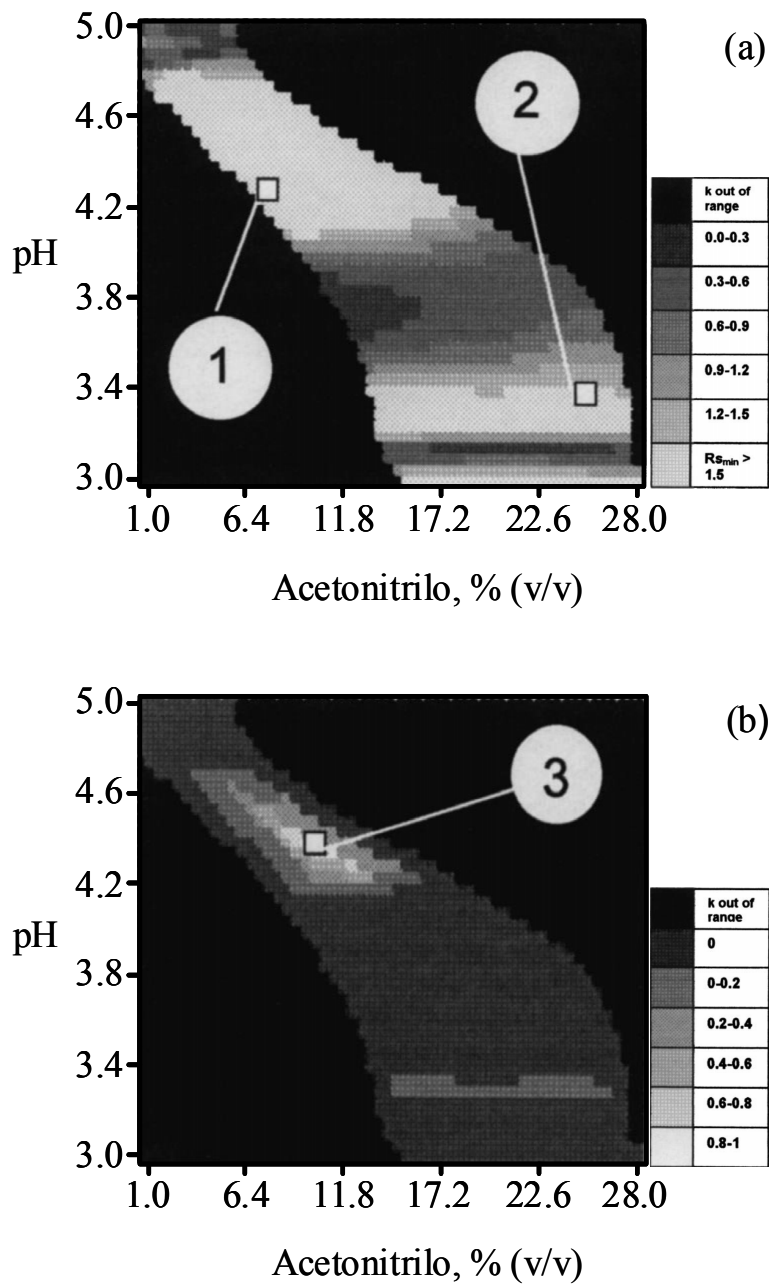
Es posible combinar la resolución y los requisitos secundarios en una única medida. Sin embargo, cuando el número de requisitos involucrados en la COF aumenta, la interpretación del valor numérico final se complica. Por esta razón, el número de requisitos incluidos en la mayoría de las COFs mixtas se halla generalmente limitado a la resolución del pico, el tiempo de análisis y/o la robustez.

Quizás, el requisito secundario más importante es el tiempo de análisis. Ciertamente, el tiempo necesario para completar una separación es decisivo en un análisis de rutina, por lo que puede ser preferible una peor separación bajo el punto de vista de la resolución si ésta implica una reducción en el tiempo de análisis significativa [8,131]. Este tipo de consideración puede incluirse en la COF. La función de Berridge es un buen ejemplo que sigue utilizándose [148]:

$$COF = \sum_{i=1}^L R_i + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 |T_1 - T_0| \quad (1.55)$$

donde  $R_i$  es la resolución entre dos picos adyacentes,  $L$  el número de picos resueltos en el cromatograma,  $T_A$ ,  $T_L$ ,  $T_1$ ,  $T_0$  son el tiempo máximo aceptable ( $T_A$ ), los tiempos de retención del último ( $T_L$ ) y primer pico ( $T_1$ ), y el tiempo de retención mínimo del primer pico ( $T_0$ ), respectivamente; y  $w_{1-3}$  son los parámetros de ponderación, que deben ser fijados por el usuario de acuerdo a los objetivos perseguidos. La importancia del tiempo en la separación puede aumentarse incrementando el valor de los factores de ponderación  $w_2$  y  $w_3$ .

A fin de conseguir diversos objetivos, es más frecuente realizar la combinación de COFs. Una forma simple de aplicar esta estrategia es dibujar un mapa donde los umbrales de aceptabilidad para las distintas funciones se superponen. Esto permite la localización de regiones aceptables compartidas [92]. Otras estrategias están basadas en los denominados constructores de toma de decisión multicriterio. La deseabilidad de Derringer es el más común [149–153] (Figura 1.9). Este concepto requiere la selección arbitraria de dos valores umbral (i.e. de penalización y de inaceptabilidad) para cada función que se combine. De este modo se establecen tres regiones por función: por debajo del primer umbral se establece un valor de deseabilidad unidad, entre ambos umbrales la deseabilidad varía entre 1 y 0, y por encima del segundo umbral, su valor es 0. Finalmente, las deseabilidades obtenidas para todos los criterios se combinan, usualmente mediante una media geométrica. En la mayoría de los casos, la función de



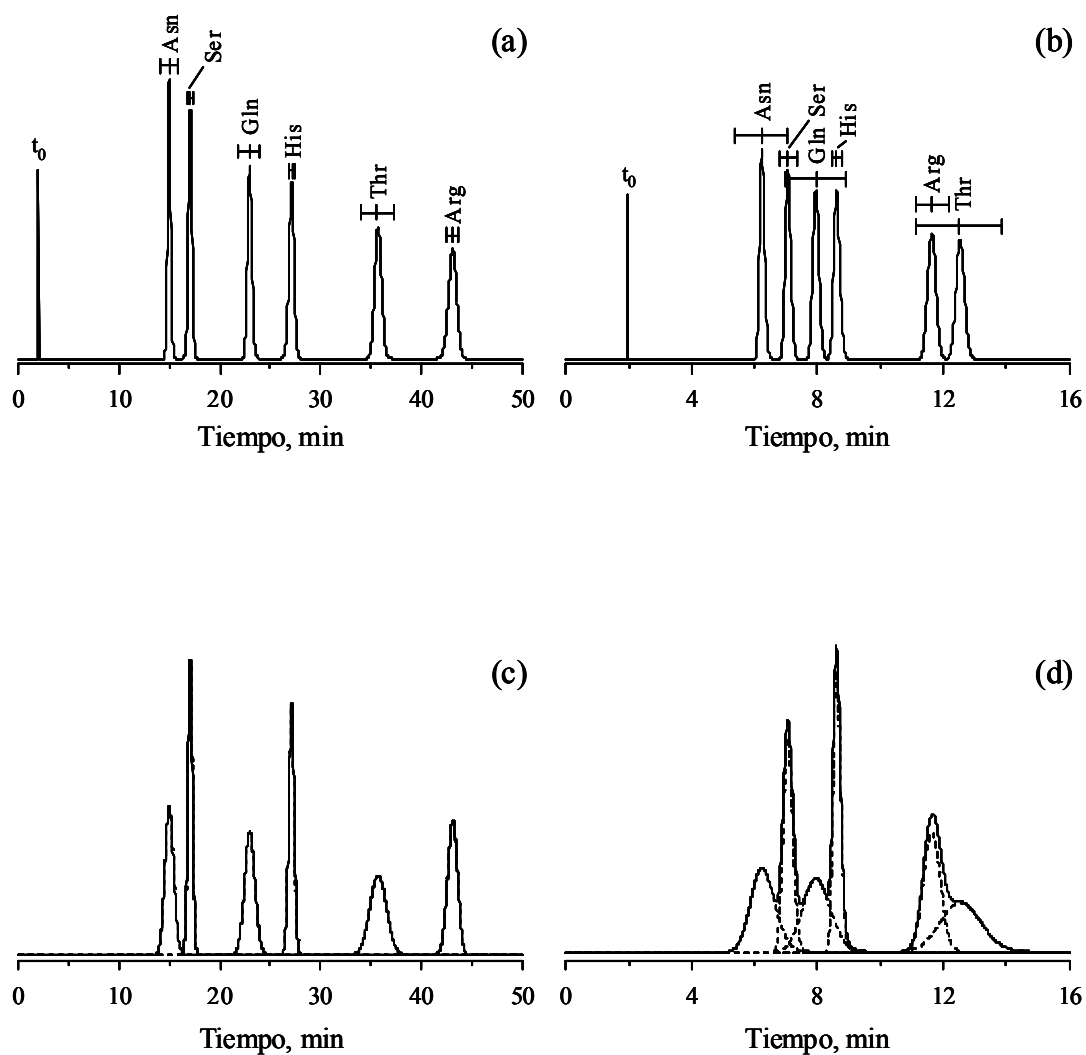
**Figura 1.9.** Mapas de respuesta para una mezcla de seis ácidos benzoicos: (a)  $R_s$  para el pico peor resuelto, y (b) función de deseabilidad considerando  $R_s$  y la robustez. Se indican los óptimos [154].

transferencia es lineal, pero en ocasiones pueden utilizarse otras funciones (e.g. logísticas). Puesto que los umbrales seleccionados y el perfil de penalización son arbitrarios, los óptimos predichos pueden variar ampliamente, lo que constituye el punto más débil de este planteamiento.

Una alternativa a la combinación de funciones es el concepto de óptimo de Pareto [152,155]. Una condición de separación es óptima de acuerdo a este criterio cuando una cierta propiedad no puede mejorarse sin empeorar cualquiera de las otras propiedades optimizadas. Así, un óptimo de Pareto no es una única condición, sino un conjunto de condiciones que constituyen lo que se llama un frente de Pareto. Esto significa que el usuario debe realizar la decisión final. La aplicación de este criterio es quizás más simple que establecer los umbrales de Derringer. Por otro lado, el número de referencias para ambos métodos es similar.

La robustez en la optimización cromatográfica interpretativa se mide generalmente como la sensibilidad de la COF a variaciones en una determinada condición de separación, que puede ser la óptima o cualquier otra [156–158]. Sin embargo, esto deja de lado la incertidumbre introducida por el modelo de retención, que en algunos casos constituye la fuente dominante de error, incluso en ausencia de falta de ajuste. En efecto, las predicciones de la COF poseen una precisión limitada, ya que los modelos que las sostienen implican una cierta incertidumbre asociada al proceso de ajuste, cuyo origen se halla en los datos experimentales, las características de ajuste del modelo de retención, y el procedimiento de regresión [159].

Con frecuencia, las incertidumbres asociadas a los modelos pueden evaluarse sin realizar experimentos adicionales. Esto es posible cuando se ajustan a un modelo insesgado utilizando un método de mínimos cuadrados, siempre que existan algunos grados de libertad. La robustez puede evaluarse en este caso como la susceptibilidad de la COF a las incertidumbres asociadas a los modelos de retención, lo que puede establecerse de acuerdo a diversas estrategias [159]. Una de ellas consiste en implementar las incertidumbres en la posición del pico como un ensanchamiento extra para cada pico cromatográfico. Como resultado, se obtienen cromatogramas sintéticos con picos ampliados (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Cromatogramas convencionales (a,b) y cromatogramas que consideran las incertidumbres en los tiempos de retención (c,d) para una mezcla de derivados de aminoácidos eluidos con 7.5% (a,c) y 12.3% (b,d) de acetonitrilo [159]. En (a) y (b), se han superpuesto los intervalos al 95% de confianza.

### **1.5.5. Obtención de condiciones de separación robustas**

La condición encontrada tras aplicar un proceso de optimización no será útil si es tan crítica que el cromatograma óptimo predicho no puede reproducirse experimentalmente. La falta de robustez puede depender de las dificultades en establecer, con suficiente exactitud, los valores nominales de los factores experimentales para las condiciones óptimas. Las principales causas de error se hallan asociadas a la instrumentación y al material volumétrico utilizados, a las variaciones aleatorias en los factores experimentales nominales, a variables medio-ambientales no controladas, a la variación en la composición de las fases móviles y a los errores asociados a los modelos de retención. La selección de la fase móvil óptima debería considerar, por lo tanto, además del nivel de resolución y otros objetivos, la viabilidad de su implementación. Hasta cierto punto, un procedimiento capaz de realizar este tipo de discriminación durante el desarrollo del método puede ser considerado como una “pre-validación”. Los beneficios introducidos en términos de ahorro de tiempo y esfuerzo son evidentes, puesto que no se invertirá esfuerzo en condiciones que no tengan garantías de ser viables experimentalmente.

Los picos ensanchados incluyen dos fuentes de varianza: la originada por la difusión del soluto y la proveniente de las incertidumbres en los tiempos de retención propagados por los modelos de retención. Estos cromatogramas ficticios se utilizan para calcular las purezas de pico teniendo en cuenta los desplazamientos en los tiempos de retención. El método también puede aplicarse utilizando otros criterios de resolución elemental.

Otro método, más próximo a la realidad, consiste en mimetizar las fluctuaciones del pico en cromatogramas sintéticos replicados, donde se establece la posición de cada pico considerando los intervalos de confianza de los tiempos predichos. Esta estrategia intenta imitar los resultados que se obtendrían al realizar un gran número de inyecciones replicadas, sin necesidad de realizar ningún experimento.

Nótese que los dos métodos comentados requieren el conocimiento de cada pico individual, por lo que no pueden aplicarse a cromatogramas experimentales reales, excepto en situaciones donde todos los picos se resuelvan, lo que limita su interés práctico.

## 1.6. Referencias

1. S.T. Balke, Quantitative Column Liquid Chromatography: A Survey of Chemometric Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.
2. P.J. Schoenmakers, Optimisation of Chromatographic Selectivity: A Guide to Method Development, Elsevier, Amsterdam, 1986.
3. S. Ahuja, Selectivity and Detectability Optimisation in HPLC, Wiley, New York, 1989.
4. L.R. Snyder, Analyst 116 (1991) 1237.
5. R.M. Smith (Ed.), Retention and Selectivity in Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1995.
6. P.H. Lukulay, V.L. McGuffin, J. Microcolumn Sep. 8 (1996) 211.
7. L.R. Snyder, Practical HPLC Method Development, 2nd Edition, Wiley, New York, 1997.
8. A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, J. Chromatogr. A 892 (2000) 75.
9. J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 308.
10. P. Haber, T. Baczek, R. Kaliszan, L.R. Snyder, J.W. Dolan, C.T. Wehr, J. Chromatogr. Sci. 38 (2000) 386.
11. T.H. Jupille, J.W. Dolan, L.R. Snyder, I. Molnar, J. Chromatogr. A 948 (2002) 35.
12. I. Molnar, J. Chromatogr. A 965 (2002) 175.
13. R. Cela, M. Lores, Comput. Chem. 20 (1996) 193.
14. S. Heinisch, E. Lesellier, C. Podevin, J.L. Rocca, A. Tchaplal, Chromatographia 44 (1997) 529.
15. J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 187.
16. J.R. Torres-Lapasi3, MICHROM Software, Marcel Dekker, New York (2000).
17. W.D. Beinert, R. Jack, V. Eckert, S. Galushko, V. Tanchuck, I. Shishkina, Int. Lab. 31 (2001) 16.
18. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, J. Chromatogr. 205 (1981) 13.
19. M.A. Quarry, R.L. Grob, L.R. Snyder, Anal. Chem. 58 (1986) 907.
20. G. Viv3 Truyols, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1018 (2003) 169.



21. J.K. Strasters, F. Coolsaet, A. Bartha, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 523.
22. N.M. Djordjevic, F. Erni, B. Schreiber, E.P. Lankmayr, W. Wegscheider, L. Jaufmann, *J. Chromatogr.* 550 (1991) 27.
23. I. Molnar, K.H. Gober, B. Christ, *J. Chromatogr.* 550 (1991) 39.
24. G. Stoev, A. Mihailova, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 275.
25. P.V. van Zomeren, A. Hoogvorst, P.M.J. Coenegracht, G.J. de Jong, *Analyst* 129 (2004) 241.
26. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 31.
27. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tijssen, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 519.
28. K. Valko, L.R. Snyder, J.L. Glajch, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 501.
29. C.H. Lochmueller, C. Reese, A.J. Aschman, S.J. Breiner, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 3.
30. W. Prus, Y. Vander Heyden, P. Kus, D.L. Massart, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* 7 (1997) 194.
31. T. Kowalska, W. Prus, *Acta Chromatogr.* 7 (1997) 210.
32. W. Prus, Y. Vander Heyden, P. Vankeerberghen, P. Kus, D.L. Massart, T. Kowalska, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 47 (1999) 253.
33. T. Baczek, M. Markuszewski, R. Kaliszan, M.A. van Straten, H.A. Claessens, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 667.
34. J. Ko, J.C. Ford, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 3.
35. W. Zapala, K. Kaczmarski, T. Kowalska, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 575.
36. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, P. Agrafiotou, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 33.
37. A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, P. Balkatzopoulou, C. Malliakas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 29.
38. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 19.
39. J.W. Dolan, *LC–GC–Int.* 9(1996) 130.
40. L.R. Snyder, J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 3.
41. A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, *Chromatographia* 53 (2000) 477.
42. A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, *Chromatographia* 53 (2000) 487.

43. A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, *Chromatographia* 57 (2003) 169.
44. A.C.J.H. Drouen, H.A.H. Billiet, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, *Chromatographia* 16 (1982) 48.
45. P.M.J. Coenegracht, H.J. Metting, A.K. Smilde, P.J.M. Coenegracht–Lamers, *Chromatographia* 27 (1989) 135.
46. A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, M. Karageorgaki, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 2131.
47. K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepmann, F. Bohlmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 661 (1963) 1.
48. J. Barbosa, R. Berges, V. Sanz–Nebot, *Chromatographia* 51 (2000) 417.
49. B.P. Johnson, M.G. Khaledi, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2354.
50. M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147.
51. E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.
52. M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 129.
53. O. Jiménez, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 149.
54. S. López Grío, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 381 (1999) 275.
55. J.W. Dolan, D.C. Lommen, L.R. Snyder, *J. Chromatogr.* 485 (1989) 91.
56. P. Chaminade, A. Baillet, D. Ferrier, *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 67.
57. R. Cela, M. Lores, *Comput. Chem.* 20 (1996) 175.
58. P. Jandera, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 133.
59. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 183.
60. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 283.
61. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 279.
62. L.R. Snyder, J.W. Dolan, *Adv. Chromatogr.* 38 (1998) 115.
63. V. Concha Herrera, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 79.
64. J.C. Ford, J. Ko, *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 1.
65. R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 417.
66. T. Baczek, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 41.
67. T. Baczek, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 29.

68. R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 (2003) 1240.
69. T. Hancock, R. Put, D. Coomans, Y. Vander Heyden, Y. Everingham, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 185.
70. M. Rosés, D. Bolliet, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 29.
71. D. Bolliet, C.F. Poole, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 129.
72. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, *Anal. Chim. Acta* 515 (2004) 209.
73. M.H. Abraham, University College London, London, UK, 2000.
74. K. Jinno, K. Kawasaki, *Anal. Chim. Acta* 152 (1983) 25.
75. S.K. Poole, C.F. Poole, *J. Chromatogr. B* 797 (2003) 3.
76. T. Hanai, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 279.
77. R.P.W. Scott, *Silica Gel and Bonded Phases, Their Production, Properties and Use in LC*, Wiley, Chichester, 1993.
78. M.H. Abraham, H.S. Chadha, A.J. Leo, *J. Chromatogr. A* 685 (1994) 203.
79. C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 635.
80. A.R. Katritzky, V.S. Lohanov, M. Karelson, CODESSA V. 2.13, Semichem and the University of Florida, 1997.
81. F. Szokoli, ZS. Németh, J. Inczédy, *Chromatographia* 29 (1990) 265.
82. R.M. Lopes-Marques, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 157.
83. J.A. Lewis, D.C. Lommen, W.D. Raddatz, J.W. Dolan, L.R. Snyder, I. Molnar, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 183.
84. J.A. Lewis, J.W. Dolan, L.R. Snyder, I. Molnar, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 197.
85. P.J. Schoenmakers, N. Mackie, R.M. Lopes-Marques, *Chromatographia* 35 (1993) 18.
86. R.M. Lopes-Marques, P.J. Schoenmakers, C.B. Lucasius, L. Buyden, *Chromatographia* 36 (1993) 83.
87. P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, *J. Chromatogr. A* 656 (1993) 577.
88. E. Peyrin, F.X. Perrin, Y.C. Guillaume, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2708.
89. R. Berges, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *J. Chromatogr.* 869 (2000) 27.
90. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 47.
91. S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 83.

92. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 51.
93. N. Sanli, G. Fonrodona, J. Barbosa, G.A. Ozkan, J.L. Beltrán, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 53.
94. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 893 (2000) 321.
95. A.H. Rodgers, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, J. Chromatogr. A 636 (1993) 203.
96. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 769 (1997) 155.
97. J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, Chromatographia 51 (2000) 101.
98. M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A, 982 (2002) 1.
99. I. Canals, J.A. Portal, M. Rosés, E. Bosch, Chromatographia 55 (2002) 565.
100. S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 74 (2002) 3809.
101. J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 521 (2004) 61.
102. L.A. Cole, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 64 (1992) 1317.
103. D. Guillarme, S. Heinisch, J.L. Rocca, J. Chromatogr. A 1052 (2004) 39.
104. J. Li, P.W. Carr, Anal. Chem. 69 (1997) 837.
105. J.W. Dolan, J. Chromatogr. A 965 (2002) 195.
106. C.B. Castells, L.G. Cagliardi, C. Rafols, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 23.
107. R.C. Chloupek, W.S. Hancock, B.A. Marchylo, J.J. Kirkland, B.E. Boyes, L.R. Snyder, J. Chromatogr. A 686 (1994) 45.
108. J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, T.J. Waeghe, J. Chromatogr. A 857 (1999) 21.
109. R.G. Wolcott, J.W. Dolan, L.R. Snyder, J. Chromatogr. A 869 (2000) 3.
110. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, L. van Heukelem, J. Chromatogr. A 897 (2000) 37.
111. L. Escuder Gilabert, J.M. Bermúdez Saldaña, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, S. Sagrado, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 247.
112. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier, Amsterdam, 1998.

113. J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 886 (2000) 31.
114. B.F.D. Ghrist, B.S. Cooperman, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 459 (1988) 1.
115. J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P. Haber, T. Baczek, R. Kaliszan, L. Sander, J. Chromatogr. A 857 (1999) 41.
116. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T.H. Jupille, N.S. Wilson, J. Chromatogr. A 960 (2002) 51.
117. V. Concha Herrera, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 518 (2004) 191.
118. M.S. Jeansonne, J.P. Foley, J. Chromatogr. 594 (1992) 1.
119. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chem. 69 (1997) 3822.
120. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, J. Chromatogr. A 912 (2001) 13.
121. R.D. Caballero, M.C. García Álvarez-Coque, J.J. Baeza Baeza, J. Chromatogr. A 954 (2002) 59.
122. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 146.
123. P.J. Schoenmakers, J.K. Strasters, A. Bartha, J. Chromatogr. 458 (1988) 355.
124. J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 55 (1983) 730.
125. J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17.
126. E. Fuguet, C. Ràfols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 74 (2002) 4447.
127. R.W. Stout, J.J. DeStefano, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 282 (1983) 263.
128. P. Jandera, J. Chromatogr. 485 (1989) 113.
129. T.D. Schlabach, J.L. Excoffier, J. Chromatogr. 439 (1988) 173.
130. S. Sekulic, P.R. Haddad, J. Chromatogr. 485 (1989) 501.
131. R. Cela, C.G. Barroso, J.A. Pérez-Bustamante, J. Chromatogr. 485 (1989) 477.
132. S. Heinisch, J.L. Rocca, Chromatographia 41 (1995) 544.
133. R. Cela, E. Leira, O. Cabaleiro, M. Lores, Comput. Chem. 20 (1996) 285.
134. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 61.
135. E.J. Klein, S.L. Rivera, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 23 (2000) 2097.
136. V. Harang, A. Karlsson, M. Josefson, Chromatographia 54 (2001) 703.

137. S.J. L3pez Gr3o, G. Viv3 Truyols, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 187.
138. R.D. Caballero, S.J. L3pez Gr3o, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 24 (2001) 1895.
139. Y. Dharmadi, R. Gonz3lez, *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 89.
140. Y.P. Zhang, K.P. Lee, H.J. Noh, A.M. Showkat, S.H. Choi, *Microchem. J.* 78 (2004) 99.
141. F. Safa, M.R. Hadjmohammadi, *J. Chromatogr. A* 1078 (2005) 42.
142. G. Viv3 Truyols, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 47.
143. G. Viv3 Truyols, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 17.
144. G. Viv3 Truyols, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, *Chromatographia* 56 (2002) 699.
145. J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, E. Bosch, M. Ros3s, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 170.
146. G. Viv3 Truyols, J.R. Torres Lapasi3, M.C. Garc3a 3lvarez-Coque, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 59 (2001) 89.
147. T.L. Chester, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 181.
148. J.C. Berridge, *J. Chromatogr.* 244 (1982) 1.
149. G. Derringer, R. Suich, *J. Quality Technol.* 12 (1980) 214.
150. A.K. Smilde, A. Knevelman, P.M.J. Coenegracht, *J. Chromatogr.* 369 (1986) 1.
151. S.N. Deming, *J. Chromatogr.* 550 (1991) 15.
152. R. Cela, J.A. Mart3nez, C. Gonz3lez Barreiro, M. Lores, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 69 (2003) 137.
153. M.J. Saiz Abajo, J.M. Gonz3lez Saiz, C. Pizarro, *Anal. Chim. Acta* 528 (2005) 63.
154. S. Goga-Remont, S. Heinisch, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 13.
155. E. van Gyseghem, M. Jimidar, R. Sneyers, D. Redlich, E. Verhoeven, D.L. Massart, Y. Vander-Heyden, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 69.
156. J. Wieling, P.M.J. Coenegracht, D.A. Doornbos, J.H.G. Jonkman, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 195.
157. P.F. Vanbel, B.L. Tilquin, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 3.

158. P.F. de Aguiar, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 223.
159. G. Vivó Truyols, V. Concha Herrera, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 123.





## Capítulo 2

### **Uso de marcadores y de series homólogas en la estimación del tiempo muerto en cromatografía líquida en fase inversa**

#### **2.1. Resumen**

Se revisan dos métodos para la estimación del tiempo muerto (el uso de marcadores y el método matemático de la serie homóloga). De los doce marcadores de uso común ensayados, sólo KBr, KI, tartrazina, tiourea, uracilo y urea proporcionaron tiempos de retención independientes de la composición de la fase móvil, en el intervalo 10–90% de acetonitrilo, utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18. Por otro lado, la calidad de las estimaciones proporcionadas por el método de la serie homóloga se ve limitado por el tratamiento matemático y la calidad de los datos procesados. En este método, el tiempo muerto estimado es un valor extrapolado, por lo que se halla seriamente afectado por los tiempos de retención de los compuestos más retenidos, que actúan como niveladores, sesgando el resultado. Se comprobó que la eliminación secuencial de los compuestos más retenidos atenúa este problema. De ahí que la serie homóloga procesada debería contener al menos cuatro compuestos con retención baja. En caso contrario, se producen sobreestimaciones del tiempo muerto.

## 2.2. Introducción

El volumen muerto en sistemas cromatográficos líquidos se ha definido como “el volumen de fase móvil que rellena el espacio entre el inyector y la celda del detector, lo que incluye el volumen intersticial accesible (el volumen entre las partículas de la columna) y el volumen intrapartícula (los poros del empaquetamiento de la columna), así como el volumen de los tubos conectados a la columna y de cualquier otro componente del sistema” [1,2]. Relacionado con este concepto se halla el tiempo muerto, que es el tiempo que requiere un compuesto ideal no retenido (i.e. un compuesto que no interacciona con la fase estacionaria) para recorrer la distancia entre el inyector y el detector, cuando se eluye a flujo constante [3,4].

La estimación del tiempo muerto en sistemas cromatográficos es la base para el cálculo de los factores de retención:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

donde  $t_R$  es el tiempo de retención del soluto y  $t_0$  el tiempo muerto. Usualmente, se toma como valor de tiempo muerto, el tiempo muerto bruto ( $t_0^g$ , la suma del tiempo muerto de la columna y de las contribuciones extra-columnares) [5]. Se pueden calcular tiempos de retención corregidos utilizando los valores brutos o los valores obtenidos una vez sustraídas las contribuciones extra-columnares:  $t_R^g - t_0^g = (t_R + t_{\text{extra}}) - (t_0 + t_{\text{extra}}) = t_R - t_0$ . Sin embargo, estrictamente, para calcular los valores de  $k$ , los tiempos de retención corregidos deberían dividirse por el tiempo muerto de la columna y no por el tiempo muerto bruto.

Se requiere un conocimiento exacto de los factores de retención en la predicción de los tiempos de retención y de la resolución para la optimización de la separación cromatográfica, en la determinación de los coeficientes de reparto y de otros parámetros termodinámicos, así como en el establecimiento de correlaciones con distintas propiedades.

La definición de tiempo muerto implica dos importantes dificultades, especialmente en cromatografía líquida en fase inversa (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC) [6]:

- (i) Las moléculas de disolvente orgánico se adsorben sobre la fase estacionaria, formando una capa y reduciendo así el volumen accesible entre el inyector y el detector. La situación se complica debido al hecho de que los componentes más fuertes de la fase móvil se hallan asociados preferentemente a la fase estacionaria.
- (ii) Las moléculas del soluto pueden hallarse parcial o completamente excluidas de los poros de la fase estacionaria. Esto significa que diferentes solutos podrán tener asociados diferentes tiempos muertos, ya que los solutos pequeños y porciones de algunos solutos mayores podrán acceder al promedio de los poros, mientras que otros solutos no serán capaces de acceder a ellos. A este efecto debería añadirse la exclusión electroestática.

En RPLC, no es fácil definir inequívocamente los volúmenes de fase móvil y fase estacionaria, o el límite entre ambas fases [6,7]. Así, es de esperar que difieran las estimaciones de tiempo muerto proporcionadas por los distintos métodos propuestos, debido a que miden diferentes propiedades [8]. La discusión y controversia sobre este tema se han mantenido vivas durante décadas, dando lugar a varios artículos de revisión [1,3,5,6,8–11]. Se puede concluir que no se ha publicado todavía un método de aceptación general para la medida exacta del tiempo muerto.

Los métodos publicados para la estimación del tiempo muerto en RPLC se han clasificado en métodos estáticos y dinámicos. En el primer caso, no existe flujo de fase móvil y la columna se mantiene a presión atmosférica. En el segundo, la fase móvil se halla en movimiento, y existe un gradiente lineal de presión a lo largo de la columna. El método estático más usual es el picnométrico o método de la diferencia de pesos. Éste consiste en rellenar la columna empacada, sucesivamente, con dos disolventes de densidad suficientemente distinta (e.g. tetracloruro de carbono y metanol), y pesarla en cada caso [8,12]. El volumen total se obtiene a partir de las diferencias de densidad y peso. En otro método, la columna se pesa tras rellenarla con agua y secarla con una corriente de nitrógeno [12,13]. Ambos métodos proporcionan una información directa sobre el volumen muerto de la columna, pero ignoran la solvatación de la fase estacionaria por los componentes de la fase móvil. Por lo tanto, a menos que se realice una corrección para tener en cuenta la capa de solvatación, estos métodos originan sobreestimaciones del verdadero tiempo muerto de la columna. También suponen un nivel de error derivado de la estimación de una magnitud pequeña a partir de la

sustracción de dos magnitudes mayores (i.e. el peso de la columna llena con cada disolvente, o llena con un disolvente y secada). Además, el método que utiliza sólo un disolvente es poco práctico, ya que al secar la columna, a menudo ésta queda dañada de manera irreversible. Un método estático diferente consiste en medir la diferencia entre los volúmenes del tubo de la columna vacío y del material empacado dentro de la columna. Éste es un método largo de aplicar y requiere instrumentos específicos, lo que lo hace poco práctico para el uso rutinario [8]. En consecuencia, los métodos estáticos son poco utilizados.

Los métodos dinámicos implican por un lado la elución de compuestos no retenidos (métodos directos), tales como los componentes de la fase móvil (en el llamado “método de la primera perturbación”), o marcadores, y por otro, la elución de series homólogas (en el llamado “método matemático”, que es un método indirecto). El principal problema de los métodos directos es que todos los compuestos ensayados se retienen ligeramente o se hallan excluidos de la fase estacionaria [5]. Además, las medidas dependen de las condiciones experimentales [8].

Se obtiene una perturbación (o pico) debida al disolvente por inyección de un componente de la fase móvil (el agua o el disolvente orgánico), o de un volumen de fase móvil con una composición ligeramente distinta a la que se esté utilizando [6]. En general, para medir la perturbación causada por el disolvente no se requiere un detector de índice refractométrico (IR). Con frecuencia, los detectores UV evidencian los cambios en el IR a longitudes de onda bajas. Se ha propuesto, como mejor disolvente para ser inyectado, al componente más débil de la fase móvil (i.e. agua en RPLC), ya que éste no debería formar parte de la capa de solvatación. Sin embargo, cuando se inyecta agua pura, se observan al menos dos picos: el pico del agua pura, y un pico producido por el ligero exceso de disolvente orgánico en la fase móvil inmediatamente después del paso del agua, debido a la perturbación del equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria (i.e. pico de desalojo del agua).

El pico de la perturbación del disolvente podría no detectarse si el disolvente que se inyecta posee exactamente la misma composición que la fase móvil. Por esta razón, se ha recomendado el uso de componentes de la fase móvil marcados isotópicamente (compuestos deuterados, generalmente  $^2\text{H}_2\text{O}$ , o compuestos radioactivos como  $^3\text{H}_2\text{O}$  o  $^{14}\text{CH}_3\text{CN}$ ) [1]. La gran desventaja de estos compuestos isotópicos es la dificultad en su

detección. Los compuestos deuterados son transparentes en el UV, por lo que se necesita un detector de IR. Además, los picos de desalojo complican la detección, y la sensibilidad puede ser baja para ciertas mezclas hidro-orgánicas. Se ha utilizado un contador de centelleo para detectar los componentes marcados radioactivamente [3]. Estos componentes son menos comunes que los deuterados, debido a problemas relacionados con la eliminación de los residuos de disolvente, así como con la posible contaminación de la columna y el inyector (entre otros).

Debido a su simplicidad práctica, para determinar el tiempo muerto es común la inyección de marcadores que idealmente deben absorber en el UV, que pueden ser de tipo orgánico (e.g. acetona, ácido benzoico, *N,N*-dimetilformamida, nitrobenzeno, ácido pírico o uracilo), o inorgánico (e.g. KI, KNO<sub>3</sub>, NaCl, NaNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub>). En este caso, se ignora la posible retención del compuesto inyectado. Sin embargo, se ha dicho que éste es el más incierto de los métodos [6]. El compuesto no retenido ideal debería ser suficientemente pequeño como para acceder a todo el volumen disponible de fase estacionaria, y suficientemente hidrofílico como para no interaccionar con ella. Un compuesto así no es fácil de encontrar, ya que se ha comprobado que distintas moléculas neutras pequeñas muestran tiempos de retención que disminuyen al aumentar la hidrofobicidad de la fase móvil.

El uso de sales inorgánicas como marcadores es el método más discutible. La medida del tiempo muerto con estas sales se ve afectada por la composición de la fase móvil, el pH, la fuerza iónica y la cantidad de marcador inyectada. Esto se ha interpretado como una consecuencia de la exclusión de las especies cargadas de los poros del material empacado (efecto Donnan), debido a la presencia de los grupos silanol residuales. Por lo tanto, el tiempo muerto medido utilizando sales inorgánicas puede variar entre el volumen total de la fase móvil en el interior de la columna y un valor cercano al volumen interpartícula, dependiendo de las condiciones experimentales [3,5]. La adición de una disolución tampón o de una concentración elevada de sales (incluyendo el marcador) enmascara el efecto de los silanoles cargados, y permite que los iones de los marcadores penetren en el interior de los poros. Un último problema con las sales inorgánicas es su baja solubilidad en los eluyentes ricos en modificador. A pesar de estas observaciones, diversas sales inorgánicas han sido recomendadas como marcadores para estudiar el comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables, indicando que ambos son similares en su comportamiento [14].

La estimación del tiempo muerto a partir de la retención de miembros sucesivos en una serie homóloga evita las dificultades asociadas a la búsqueda de compuestos verdaderamente no retenidos. Se ha sugerido que este método es teóricamente ideal [6]. Se basa en la regla de Martin [15], la supuesta relación lineal entre  $\log k$  y el número de carbonos del homólogo ( $n_C$ ), y calcula el tiempo muerto por extrapolación. Sin embargo, posee varios inconvenientes: es largo de aplicar, requiere un procesamiento (regresión no lineal) de los datos experimentales que deben ser de calidad (i.e. poseer una elevada precisión y exactitud), y la suposición de linealidad (i.e.  $\log k$  vs.  $n_C$ ) a lo largo de una serie homóloga no parece que sea válida en RPLC: se han observado desviaciones de la linealidad para los homólogos más bajos y para los que poseen una cadena alquílica que excede a la de la fase enlazada. Se requiere un mínimo de tres homólogos para ajustar el modelo matemático, pero se recomienda utilizar al menos cuatro. La elección de la serie homóloga se basa en su disponibilidad, solubilidad en la fase móvil, retención y detección. Una sola serie no es capaz de cubrir todo el intervalo de composiciones de la fase móvil, ya que la solubilidad y la retención de los homólogos mayores se hace rápidamente inapropiada al disminuir el contenido de disolvente orgánico [3,6,9,16].

En uno de los primeros trabajos sobre el tema, Berendson et al. [9] afirmaron que los resultados obtenidos mediante el método de la serie homóloga son (o deberían ser) independientes de la serie homóloga utilizada. Sin embargo, la mayoría de autores han encontrado una dependencia significativa. Así, Krstulovic et al. [16] observaron una variación considerable en los valores de tiempo muerto para diferentes series homólogas, especialmente cuando se utilizaba un número limitado de homólogos con un número de carbonos predominantemente bajo. Nowotnik y Narra [17] obtuvieron valores de tiempo muerto razonablemente concordantes a partir de la serie de los alcanos, mientras que los valores obtenidos a partir de los alquilbencenos discrepaba de manera significativa. Otros autores [2,18] señalaron que la estimación del tiempo muerto a partir de los datos de retención de los alquilbencenos es poco fiable.

Aunque no suficientemente discutida, se encuentra en la bibliografía alguna luz sobre la razón de la obtención de distintos valores de tiempo muerto a partir de diferentes series de homólogos. Así, Haken et al. [19] señalaron que los cálculos matemáticos para la estimación del tiempo muerto se ven fuertemente influidos por pequeños cambios en los tiempos de retención de los compuestos pertenecientes a la serie homóloga ensayada. Krstulovic et al. [16] observaron una dispersión considerable en los valores de tiempo

muerto calculados con el método matemático aplicado a diversas series homólogas, e interpretaron que estos resultados eran debidos a la imprecisión en los datos de retención de los homólogos poco retenidos, y/o la existencia de curvatura en la función ajustada, para los homólogos más bajos. Además, contrariamente a otros estudios que mostraban que con precauciones razonables, se podían obtener buenas estimaciones de tiempo muerto, incluso con pocos homólogos, los autores encontraron que el valor de tiempo muerto dependía de manera crítica del número y tipo de homólogos elegidos, al menos en algunos casos. Así, de acuerdo con Laub y Madden [20], el tiempo muerto se ve afectado sustancialmente por la elección del conjunto de homólogos. Finalmente, Didaoui et al. [21] observaron que las alquilarilcetonas mostraban valores de tiempo muerto significativamente más bajos, comparados con los obtenidos para las alca-2-onas y los 1-nitroalcanos, y asociaron esta diferencia a la apreciablemente mayor retención de la primera serie, y al hecho de que el tiempo muerto se obtiene por extrapolación.

En este capítulo, se comprueba la idoneidad de varios marcadores de uso común para la estimación del tiempo muerto y las condiciones de aplicación del método de la serie homóloga.

## **2.3. Parte experimental**

### **2.3.1. Compuestos y condiciones cromatográficas**

Se examinaron varios marcadores de tiempo muerto: acetona (Scharlau, Barcelona), ácido benzoico (Probus, Barcelona), *N,N*-dimetilformamida, ácido pícrico, tartrazina y urea (Panreac, Barcelona), floroglucinol dihidratado, ácido 2-nitrobenzoico y uracilo (Acros Organics, Geel, Bélgica), KBr (Prolabo, Fontenay-sous-bois, Francia), KI (Guinama, Valencia), y tiourea (Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). Las disoluciones patrón se prepararon disolviendo los compuestos en unos pocos mililitros de agua, sometiendo las disoluciones durante unos minutos a ultrasonidos, y diluyendo finalmente con una mezcla de acetonitrilo-agua. Las disoluciones inyectadas ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  excepto para el KBr que fue de  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) se prepararon en un volumen de fase móvil (acetonitrilo-agua). Los marcadores se eluyeron a través de una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 ( $150 \times 4.6$  mm,  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula, Agilent, Waldbronn, Alemania), utilizando fases móviles con un contenido de acetonitrilo (Scharlau) que varió entre el 10

y 90%, tamponando a pH 3 con ácido cítrico monohidratado (Panreac) y NaOH (Scharlau). Las disoluciones de los compuestos y de las fases móviles se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  (Cameo y Magna, respectivamente, Osmonics, Herental, Bélgica). Se utilizó agua nanopura para la preparación de todas las disoluciones (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.).

El método matemático se aplicó a la serie homóloga de las nitrosaminas y de los alquilbencenos. La primera estaba formada por ( $n_C$ ): *N*-nitrosodimetilamina (C2), *N*-nitrosometiletilamina (C3), *N*-nitrosometil-*n*-propilamina (C4), *N*-nitrosometil-*n*-butilamina (C5), *N*-nitrosodi-*n*-propilamina (C6), *N*-nitroso-*n*-propil-*n*-butilamina (C7), y *N*-nitrosodi-*n*-butilamina (C8). Se utilizó una columna Spherisorb S5CN (100×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula), y acetonitrilo o metanol en los intervalos 20–55% y 30–60% (v/v), respectivamente [22].

La serie homóloga de los alquilbencenos estaba formada por: tolueno (Scharlab), etilbenceno y butilbenceno (Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), propilbenceno (Acros Organics), y pentilbenceno (Fluka, Buchs, Suiza). Se utilizó la misma columna que para los marcadores, y la elución se llevó a cabo con mezclas no tamponadas de acetonitrilo-agua en el intervalo 50–100%.

### **2.3.2. Instrumentación y procesamiento de los datos**

Las series experimentales se llevaron a cabo con un sistema cromatográfico (Agilent, Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba isocrática (Serie 1200), un muestreador automático, un módulo de termostatación de columnas, y un detector de longitud de onda variable (Serie 1100), todo controlado por una estación de datos Agilent HPChemStation B.02.01.

En todos los casos, el flujo se fijó a 1 ml min<sup>-1</sup>, el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{l}$ , y la temperatura se mantuvo a 25°C. Se realizaron inyecciones por triplicado. Las señales se monitorizaron a 254 nm, con la excepción del KBr y la urea, que se detectaron a 207 nm.

El procesamiento de los resultados se realizó con software desarrollado en Visual Basic 6.0 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EE.UU.).



## 2.4. Tratamiento de los datos

### 2.4.1. Correlaciones entre $\log k$ e hidrofobicidad

Han aparecido un gran número de publicaciones que informan sobre las relaciones que existen entre  $\log k$  y un número de propiedades correlacionadas con la hidrofobicidad. Las más conocidas son las siguientes:

$$\log k = c_{0,1} + c_{1,1} n_C \quad (2.2)$$

$$\log k = c_{0,2} + c_{1,2} \log P_{o/w} \quad (2.3)$$

$$\log k = c_{0,3} + c_{1,3} \varphi \quad (2.4)$$

donde  $n_C$  es el número de carbonos en el homólogo,  $P_{o/w}$  el coeficiente de reparto octanol-agua, y  $\varphi$  el contenido de disolvente orgánico en la fase móvil. Sin embargo, la supuesta linealidad sólo es estrictamente válida en un intervalo relativamente estrecho de estos parámetros. En las Ecuaciones (2.2) y (2.3), el entorno cromatográfico se mantiene constante, y los resultados implicados en los ajustes corresponden a solutos de diversa hidrofobicidad. La primera ecuación se restringe a series homólogas, mientras que la segunda puede aplicarse a cualquier compuesto en ausencia de contribuciones específicas a la retención (e.g. interacciones iónicas con los grupos silanol o efectos estéricos). En contraste, la Ecuación (2.4) se basa en la alteración del entorno cromatográfico (i.e. composición de la fase móvil), atendiendo al comportamiento de retención de un único compuesto. Puede aplicarse a cualquier tipo de soluto, siempre que equilibrios secundarios eventuales, como la protólisis, no varíen a lo largo de la serie.

### 2.4.2. Método matemático de la serie homóloga

Tal y como se ha indicado en la introducción, la Ecuación (2.2) es la base del “método matemático” para la estimación del tiempo muerto, que se obtiene por extrapolación, tras combinar las Ecuaciones (2.1) y (2.2):

$$t_R = t_0 (1 + k) = t_0 (1 + k_0 e^{c_{1,1} n_C}) \quad (2.5)$$

donde  $k_0$  es el factor de retención residual para  $n_C = 0$ , y  $c_{1,1}$  la pendiente de la correlación de  $\log k$  frente a  $n_C$  (Ecuación (2.2)). Los parámetros  $t_0$ ,  $k_0$  y  $c_{1,1}$  pueden calcularse mediante regresión no lineal. Sin embargo, se comprobó que la Ecuación (2.5) escrita

como:

$$t_R = t_0 + e^{a_1 + b_1 n_C} \quad (2.6)$$

donde  $a_1$  y  $b_1$  son parámetros de ajuste, muestra unas propiedades de convergencia más favorables. Debe indicarse que estos parámetros son colineales con  $t_0$ , y en consecuencia, más inciertos que los parámetros equivalentes en la Ecuación (2.5). A pesar de ello, la estimación de  $t_0$  puede ser suficientemente precisa e insesgada. Los ajustes se llevaron a cabo utilizando el método de Powell [23], y se comprobó que eran rápidos y exactos en todos los casos.

### **2.4.3. Correlación entre la retención y la composición de la fase móvil**

Se desarrolló un nuevo método, utilizando modelos internos que relacionan  $\log k$  con el contenido de disolvente orgánico, tal como la Ecuación (2.4). Este método considera implícitamente que el tiempo muerto no se ve afectado por cambios en la composición de la fase móvil, una hipótesis sugerida por algunos autores [21,24]. Utilizando la dependencia lineal mostrada en la Ecuación (2.4), se obtiene lo siguiente:

$$t_R = t_0 (1 + k) = t_0 (1 + k_0 e^{c_{1,3} \varphi}) \quad (2.7)$$

$$t_R = t_0 + e^{a_3 + b_3 \varphi} \quad (2.8)$$

La segunda ecuación ofrece, de nuevo, mejores propiedades de convergencia.

## **2.5. Resultados y discusión**

### **2.5.1. Estimación del tiempo muerto mediante el uso de marcadores**

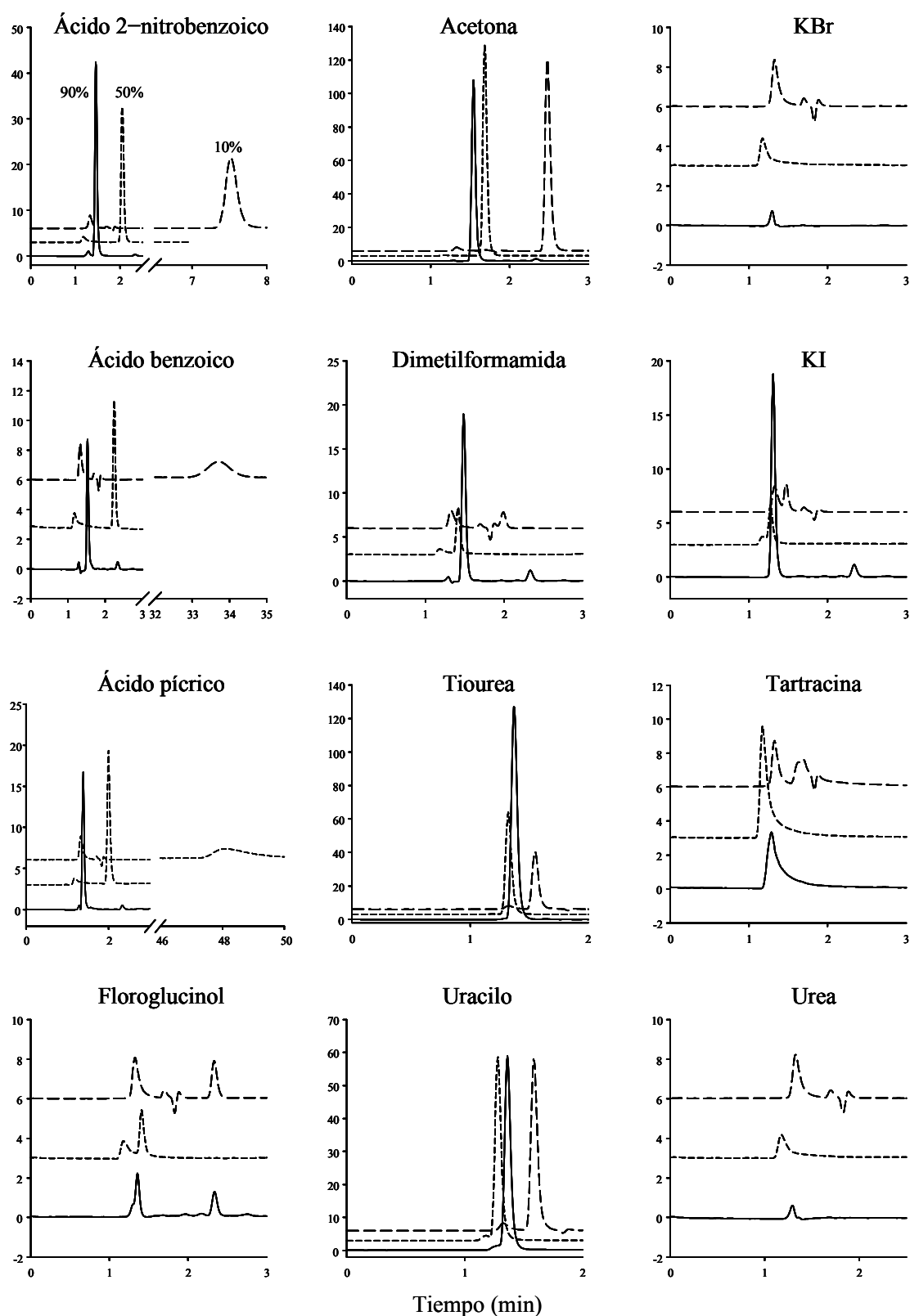
Se midió la retención, a varias composiciones de fase la móvil entre el 10 y el 90% de acetonitrilo, de 12 compuestos (orgánicos e inorgánicos), que son a menudo utilizados como marcadores del tiempo muerto. La Figura 2.1 muestra los cromatogramas correspondientes para el 10, 50 y 90% de acetonitrilo. Considerando todo el intervalo de composiciones ensayado, se observaron cambios en la retención apreciables para los ácidos 2-nitrobenzoico, benzoico y pícrico (de 7.52 a 1.46, de 33.7 a 1.53, y de 47.4 a

1.39 min, respectivamente). Se observaron pequeños cambios para dimetilformamida, acetona, y floroglucinol (de 1.99 a 1.49, de 2.48 a 1.54, y de 2.33 a 1.36 min), siendo éstos insignificantes para KBr, KI, tartrazina, tiourea, uracilo y urea. Las estimaciones del tiempo muerto para los últimos seis marcadores, obtenidas mediante la medida directa del tiempo del pico en su máximo, fueron (min):  $1.23 \pm 0.06$ ,  $1.33 \pm 0.07$ ,  $1.22 \pm 0.05$ ,  $1.38 \pm 0.08$ ,  $1.36 \pm 0.10$ , y  $1.22 \pm 0.06$ , respectivamente, con un promedio global de  $1.29 \pm 0.07$ . La medida de la primera perturbación en varios cromatogramas obtenidos con la misma columna en el intervalo de acetonitrilo 50–90% proporcionó la siguiente estimación:  $1.21 \pm 0.05$  min.

Se obtuvo la repetibilidad de las medidas del tiempo de retención inyectando diez veces consecutivas, acetona ( $1.6812 \pm 0.0003$  min), tartrazina ( $1.1599 \pm 0.0011$  min), y uracilo ( $1.2793 \pm 0.0002$  min), y eluyendo con una fase móvil de acetonitrilo al 50%. El tiempo muerto extra-columnar se midió realizando la inyección por triplicado de cuatro compuestos (acetona, *N,N*-dimetilformamida, tartrazina y uracilo) en el sistema cromatográfico, en ausencia de columna, siendo  $t_{\text{ext}} = 0.0912 \pm 0.0014$  min.

### **2.5.2. Método matemático de la serie homóloga**

En el artículo de revisión más reciente sobre la estimación del tiempo muerto [6], los autores indicaron que “el tiempo muerto obtenido con el método matemático de la serie homóloga debería ser el mismo, no importa cuál sea la serie homóloga o el número de homólogos utilizados”. El sentido común sugiere que este método debería proporcionar el mismo valor de tiempo muerto independientemente de la naturaleza de los homólogos, siempre que los efectos de exclusión sean similares. En nuestra opinión, los diferentes resultados obtenidos con diferentes series homólogas se deben mayoritariamente al propio método matemático y a la calidad de los datos procesados, ya que el tiempo muerto se obtiene por extrapolación. El problema proviene del gran peso en el ajuste de los datos de los compuestos más retenidos, que actúan como puntos niveladores. El error se incrementa en las series donde los homólogos poseen una elevada retención (i.e. compuestos altamente hidrofóbicos o fases móviles con una fuerza eluyente baja), aunque no hay que descartar el alejamiento de la linealidad indicado en la bibliografía para algunos homólogos bajos.



**Figura 2.1.** Cromatogramas para algunos marcadores de uso común, eluidos a tres composiciones de fase móvil (se indica la concentración de acetonitrilo en los cromatogramas del ácido 2-nitrobenzoico).

Krstulovic et al. [16] desarrollaron un método de convergencia para mejorar los resultados. El método consiste en el cálculo de los valores de tiempo muerto para todos los homólogos disponibles en una serie, así como para grupos de homólogos de la misma serie obtenidos por eliminación secuencial de ya sea el homólogo más bajo o el más alto de la serie. En algunos casos, las estimaciones del tiempo muerto cambiaron de forma significativa al cambiar el número de homólogos incluidos en el cálculo, poniendo de manifiesto que la elección de los homólogos posee una importancia crítica en la obtención de resultados consistentes. Además, los autores encontraron que las estimaciones realizadas tras eliminar algunos homólogos de distintas series (alcanos, alquilbencenos, ésteres metílicos, cloroalcanos y alcoholes) eran similares, con valores concordantes con los obtenidos a partir de la inyección de  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Nowotnik y Narra [17] aplicaron el ensayo de convergencia a ocho homólogos de las series de los  $n$ -alcanos y  $n$ -alquilbencenos, y señalaron que el método proporcionaba valores incorrectos cuando utilizaban menos de cuatro homólogos.

Montes et al. sugirieron el uso de pesos estadísticos sobre la variable dependiente (i.e. la retención, que es la fuente de error) [22], cuya magnitud se relacionaba inversamente con la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto estimado. De hecho, la eliminación de homólogos dentro de una serie es equivalente a la aplicación de un peso nulo. Debe indicarse que la selección de los pesos es arbitraria y afecta a los resultados.

Nosotros aplicamos el método de convergencia a dos series homólogas (nitrosaminas y alquilbencenos), eliminando secuencialmente tan sólo los homólogos con retenciones más elevadas. Los datos pertenecían a siete nitrosaminas con  $n_C = 2-8$ , eluidas con ocho mezclas de acetonitrilo-agua en el intervalo 20–55%, y siete mezclas de metanol-agua en el intervalo 30–60% [22]. Las nitrosaminas poseen dos cadenas hidrocarbonadas, sin embargo la contribución de los átomos de carbono a la retención es independiente de la pertenencia a una cadena u otra. Por otro lado, los datos de la segunda serie correspondían a cinco alquilbencenos con  $n_C = 1-5$ , eluidos con acetonitrilo-agua en el intervalo 50–100%.

La Tabla 2.1 muestra el tiempo muerto estimado a partir de la Ecuación (2.6) para las nitrosaminas eluidas con acetonitrilo y metanol, para diferentes composiciones de fase móvil, utilizando los datos de la serie completa, y tras eliminar uno a uno los homólogos con mayor tiempo de retención, hasta quedar cuatro ( $n_C = 2-5$ ). En cada caso, se muestra entre paréntesis el tiempo de retención del mayor homólogo considerado. Como se observa, al eliminar los datos se producen variaciones en el valor extrapolado de  $t_0$ , pero éste tiende a estabilizarse cuando el tiempo de retención máximo ( $t_{R,max}$ , tiempo de retención para el homólogo más elevado) se halla próximo a 5–6 min. Adoptamos el criterio arbitrario de promediar las estimaciones obtenidas cuando  $t_{R,max}$  era aproximadamente igual a dos veces el valor de  $t_0$  estimado.

De acuerdo con este criterio (ver valores en negrita en la Tabla 2.1), el valor medio de  $t_0$  fue  $2.62 \pm 0.13$  min para acetonitrilo y  $2.84 \pm 0.09$  min para metanol. No incluyendo en el promedio los valores de la serie  $n_C = 2-5$  (que contenía tan sólo cuatro homólogos), los valores medios fueron  $t_0 = 2.56 \pm 0.06$  y  $2.82 \pm 0.08$ , respectivamente. Las estimaciones realizadas por Montes et al. utilizando los mismos datos y aplicando pesos estadísticos [22] fueron:  $2.68 \pm 0.15$  y  $2.90 \pm 0.04$ , respectivamente (media de las estimaciones de los valores de tiempo muerto para diferentes composiciones de fase móvil).

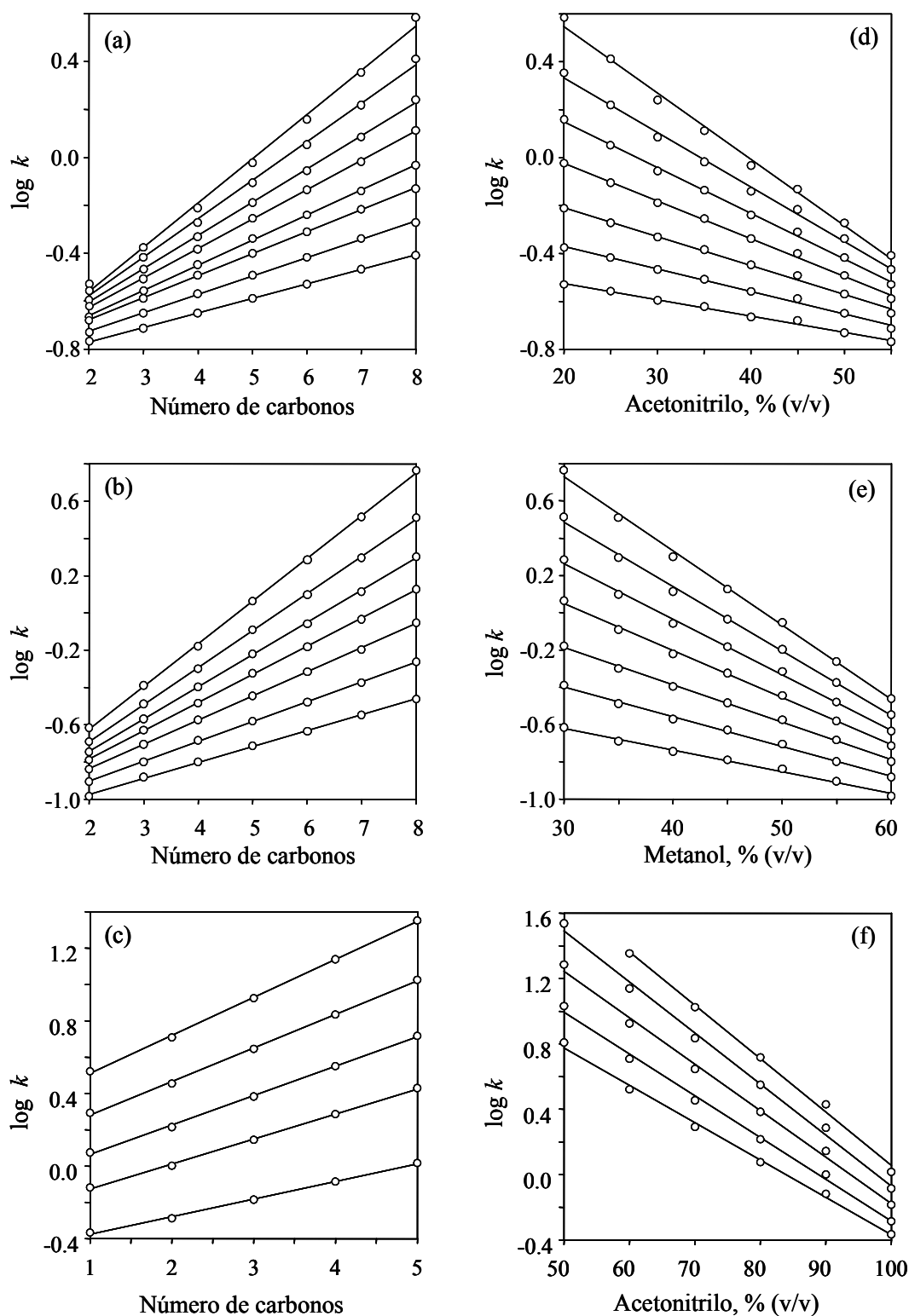
Los tiempos de retención de los alquilbencenos eran apreciablemente mayores que para las nitrosaminas, con  $t_{R,max} = 46.7$  min para el homólogo con  $n_C = 4$  eluido con acetonitrilo al 50%. Como la serie contenía cinco homólogos, se pudo eliminar tan sólo un homólogo en la aplicación del método de convergencia. Posteriores eliminaciones dieron lugar a estimaciones inconsistentes, debido a la falta de información. El  $t_0$  estimado fue  $1.58 \pm 0.08$  min, valor que debe compararse con la estimación realizada con los marcadores:  $1.29 \pm 0.07$  min. Por lo tanto, probablemente el valor de tiempo muerto obtenido para los alquilbencenos es incorrecto.

La Figura 2.2 muestra las correlaciones de  $\log k$  frente al número de carbonos y frente al contenido de disolvente orgánico, para las nitrosaminas eluidas con acetonitrilo y metanol, y para los alquilbencenos eluidos con acetonitrilo, donde se adoptó como valor de tiempo muerto,  $t_0 = 2.62$ ,  $2.84$  (obtenidos tras aplicar el método de las series homólogas), y  $1.29$  min (obtenido con marcadores), respectivamente. En general, se observó una buena linealidad, con pequeñas desviaciones en algunos casos para las fases móviles más débiles o los solutos más lentos.

**Tabla 2.1.** Tiempos muertos estimados (min) a partir de la Ecuación (6) para una serie de nitrosaminas, a lo largo de la eliminación secuencial de homólogos.<sup>a</sup>

Composición de la fase móvil (% v/v)									
Acetonitrilo	20	25	30	35	40	45	50	55	
$n_C = 2-8$	3.12 (12.76)	2.99 (9.44)	2.83 (7.23)	2.71 (6.06)	<b>2.60</b> (5.09)	<b>2.56</b> (4.59)	<b>2.46</b> (4.05)	<b>2.60</b> (3.67)	
$n_C = 2-7$	2.94 (8.61)	2.84 (7.00)	2.73 (5.85)	<b>2.62</b> (5.17)	<b>2.49</b> (4.55)	<b>2.60</b> (4.24)	<b>2.56</b> (3.85)	<b>2.62</b> (3.67)	
$n_C = 2-6$	2.79 (6.44)	2.73 (5.62)	<b>2.62</b> (4.96)	<b>2.61</b> (4.57)	<b>2.49</b> (4.16)	<b>2.54</b> (3.93)	<b>2.43</b> (3.65)	<b>2.66</b> (3.42)	
$n_C = 2-5$	<b>2.93</b> (5.14)	<b>2.87</b> (4.71)	<b>2.80</b> (4.35)	<b>2.81</b> (4.11)	<b>2.66</b> (3.85)	<b>2.59</b> (3.69)	<b>2.41</b> (3.49)	<b>2.64</b> (3.32)	
Metanol	30	35	40	45	50	55	60		
$n_C = 2-8$	3.16 (19.71)	3.08 (12.27)	3.01 (8.67)	2.97 (6.76)	<b>2.97</b> (5.45)	<b>2.90</b> (4.47)	<b>2.88</b> (3.89)		
$n_C = 2-7$	3.00 (12.33)	2.97 (8.60)	2.91 (6.65)	<b>2.88</b> (5.56)	<b>2.84</b> (4.73)	<b>2.84</b> (4.11)	<b>2.82</b> (3.71)		
$n_C = 2-6$	2.83 (8.46)	2.77 (6.51)	<b>2.78</b> (5.42)	<b>2.75</b> (4.79)	<b>2.77</b> (4.29)	<b>2.81</b> (3.85)	<b>2.66</b> (3.56)		
$n_C = 2-5$	3.02 (6.24)	<b>2.99</b> (5.24)	<b>2.93</b> (4.63)	<b>2.91</b> (4.26)	<b>2.83</b> (3.93)	<b>2.86</b> (3.65)	<b>2.66</b> (3.45)		

<sup>a</sup> Se proporciona entre paréntesis el tiempo de retención del homólogo más elevado ( $t_{R,max}$ , min). Se han marcado en negrita los tiempos muertos estimados para  $t_{R,max} \leq 2t_0.G$



**Figura 2.2.** Correlación entre  $\log k$  y el número de carbonos del homólogo (a,b,c), o el contenido de disolvente orgánico (d,e,f) para nitrosaminas (a,b,d,e) y alquilbencenos (c,f). De abajo a arriba: (a,b)  $n_C = 2$  a 8, (c)  $n_C = 1-5$ , (d) 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55% acetonitrilo, (e) 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60% de metanol, (f) 50, 60, 70, 80, 90 y 100% de acetonitrilo.



### **2.5.3. Correlación entre la retención y la composición de la fase móvil**

En la sección anterior, se trataron por filas los datos de una matriz donde el número del homólogo correspondía a las filas, y la composición de la fase móvil a las columnas (Ecuación (2.6)). En este apartado, se muestra un tratamiento similar al del método de la serie homóloga, procesando los datos por columnas (Ecuación (2.8)).

Existen tan sólo unas pocas publicaciones sobre la estimación del tiempo muerto que incluyan estudios sobre el efecto de la composición de la fase móvil. Sin embargo, existe una opinión algo generalizada de que el tiempo muerto varía con el contenido de disolvente orgánico. De hecho, esto no es sorprendente a la vista de los resultados mostrados para varios marcadores de uso común, cuyos tiempos de retención disminuyen significativamente al aumentar la fuerza eluyente del disolvente. Knox y Kaliszan estimaron el volumen total de los componentes del eluyente dentro de la columna mediante la inyección de muestras de dichos componentes marcados isotópicamente [24]. Encontraron que el tiempo muerto no dependía de la composición de la fase móvil, obteniendo valores muy similares para diferentes mezclas de disolventes en intervalos amplios de composición. También, Wainwright et al. [18] encontraron una variación insignificante en los valores de tiempo muerto estimados al modificarse el contenido de modificador orgánico, para varias series homólogas (alcan-2-onas, alquilarilcetonas y 1-nitroalcanos), con valores similares para acetonitrilo y metanol.

Asumiendo que el tiempo muerto se halla afectado de forma despreciable por el contenido de disolvente orgánico, se realizó un ajuste directo de la Ecuación (2.8), individualmente para cada nitrosamina. Se encontró que el tiempo muerto dependía fuertemente del compuesto (Tabla 2.2). La dependencia era incluso mayor que la observada al aplicar el método de la serie homóloga a varias composiciones de fase móvil (Tabla 2.1).

Estos resultados muestran la razón por la que la Ecuación (2.8) (u otra similar) no se haya aplicado con anterioridad a la estimación del tiempo muerto. Sin embargo, el comportamiento observado debería interpretarse de nuevo, al menos en parte, como debido al diverso intervalo de tiempos de retención que muestra cada soluto y a la insuficiente exactitud en la medida de los tiempos de retención (y del contenido de disolvente orgánico). Nótese que  $n_C$  es un número escalar, por lo que las incertidumbres en el ajuste de la Ecuación (2.6) deberían asignarse solamente a  $k$ .

**Tabla 2.2.** Tiempos muertos estimados (min) a partir de la Ecuación (2.8) para los homólogos individuales.<sup>a</sup>

Intervalo de composiciones (% v/v)	1	2	3	4	5	6	7	8
Número de átomos de carbono ( $n_C$ )								
Nitrosaminas y acetonitrilo-agua								
20–55		2.19±0.69 (3.42)	2.16±0.41 (3.75)	2.32±0.25 (4.27)	2.60±0.14 (5.14)	2.83±0.13 (6.32)	3.08±0.13 (8.61)	3.31±0.13 (12.76)
25–55		2.19±0.69 (3.37)	1.95±0.56 (3.65)	1.90±0.36 (4.06)	2.39±0.15 (4.71)	2.67±0.13 (5.57)	2.91±0.13 (7.00)	3.16±0.13 (9.44)
Nitrosaminas y metanol-agua								
30–60		2.87±0.19 (3.59)	2.97±0.11 (4.07)	3.00±0.11 (4.85)	3.10±0.12 (6.24)	3.24±0.16 (8.27)	3.39±0.09 (12.33)	3.64±0.12 (19.71)
35–60		– <sup>b</sup>	2.59±0.16 (3.83)	2.64±0.07 (4.35)	2.76±0.03 (5.24)	2.83±0.12 (6.40)	2.95±0.05 (8.60)	3.03±0.14 (12.27)
Alquilbencenos y acetonitrilo-agua								
50–100	1.73±0.09 (9.81)	1.90±0.13 (15.51)	2.20±0.24 (26.79)	2.67±0.42 (46.73)	– <sup>c</sup>			
60–100	1.41±0.02 (5.70)	1.41±0.05 (8.06)	1.41±0.11 (12.41)	1.42±0.07 (19.48)	1.43±0.15 (31.10)			

<sup>a</sup> Se proporciona entre paréntesis el tiempo de retención (min) para la fase móvil más débil. <sup>b</sup> No se llegó a una convergencia apropiada.<sup>c</sup> El tiempo de retención del pentilbenceno era >65 min.

El valor medio de tiempo muerto (considerando sólo los solutos con un tiempo de retención máximo  $t_{R,\max} \leq 2 t_0$ ) fue  $2.32 \pm 0.20$  y  $2.11 \pm 0.23$  para las nitrosaminas eluidas con acetonitrilo en los intervalos 20–55% y 25–55%, respectivamente, y  $2.95 \pm 0.07$  y  $2.66 \pm 0.09$  para las nitrosaminas eluidas con metanol en los intervalos 30–60% y 35–60%, respectivamente (eliminaciones posteriores de las fases móviles más débiles dio lugar a resultados inconsistentes). Estos valores deben compararse con los obtenidos con el método de la serie homóloga:  $2.62 \pm 0.13$  min para acetonitrilo, y  $2.84 \pm 0.09$  min para metanol.

Los resultados no mejoraron de modo significativo al cambiar la relación lineal subyacente de  $\log k$  frente a  $\phi$  (Ecuación (2.3)), utilizando en su lugar otras ecuaciones alternativas (lineales o cuadráticas con  $\phi$ , o el parámetro de polaridad  $P_m^N$  [25]).

## 2.6. Conclusiones

La retención de doce marcadores de uso común en el intervalo 10–90% de acetonitrilo mostró que sólo KBr, KI, tartrazina, tiourea, uracilo y urea son compuestos verdaderamente no retenidos, aunque muestran pequeñas diferencias en el valor del tiempo muerto, lo que podría atribuirse a su distinta accesibilidad a los poros del empacado de la columna cromatográfica, y a la existencia de interacciones residuales. La selección de un único marcador es arriesgada y requiere comprobar que los cambios en la composición de la fase móvil no afectan a la estimación del tiempo muerto.

Los resultados obtenidos de la estimación del tiempo muerto a partir del método de la serie homóloga mostraron una dependencia respecto a la composición de la fase móvil. Esto se explica debido a los diferentes intervalos de retención incluidos en los ajustes. El tiempo muerto es un valor extrapolado, que se ve seriamente afectado por los datos de los compuestos más retenidos (i.e. con tiempos de retención alejados del tiempo muerto, por lo que deberían eliminarse de la serie). Se comprobó que la eliminación secuencial de los homólogos de mayor retención convergía hacia una estimación consistente del tiempo muerto. Sin embargo, esta estrategia viene limitada por la naturaleza de la serie homóloga seleccionada. Idealmente, ésta debería incluir al menos cuatro compuestos con retención baja. De las dos series ensayadas, sólo las nitrosaminas resultaron apropiadas.

El uso de las relaciones retención-composición de la fase móvil posee el mismo problema: la estimación será más o menos sesgada dependiendo de la magnitud de la retención. En algunos casos, debido a la estrecha variabilidad en los tiempos de retención con la composición de la fase móvil, o a la inexactitud en los tiempos de retención o en los contenidos de disolvente orgánico, los ajustes individuales de la Ecuación (2.8) originan errores elevados. Esto sugiere que el tratamiento simultáneo de toda la información disponible (los datos de varios homólogos y varias composiciones de la fase móvil) debe ser beneficioso.

## 2.7. Referencias

1. G. Gutnikov, L.B. Hung, *Chromatographia* 19 (1984) 260.
2. B.A. Bidlingmeyer, F.V. Warren, Jr., A. Weston, C. Nugent, P.M. Froehlich, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 275.
3. R.J. Smith, C.S. Nieass, M.S. Wainwright, *J. Liq. Chromatogr.* 9 (1986) 1387.
4. P. Overaa, *Lab. Pract.* 39 (1990) 25.
5. J. García-Domínguez, J.C. Díez-Masa, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 969.
6. C.A. Rimmer, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 219.
7. M. Rosés, I. Canals, H. Allemann, K. Siigur, E. Bosch, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4094.
8. F. Gritti, Y. Kazakevich, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 157.
9. G.E. Berendson, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, J. Inczédy, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 1669.
10. M.S. Wainwright, J.K. Haken, *J. Chromatogr.* 184 (1980) 1.
11. A. Alhedai, D.E. Martire, R.P.W. Scott, *Analyst* 114 (1989) 869.
12. E.H. Slaats, J.C. Kraak, W.J.T. Brugman, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 255.
13. R. Vespalec, Z. Simek, *Chromatographia* 32 (1991) 130.
14. F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, *Talanta* 53 (2000) 667.
15. A. Skvortsov, B. Trathnigg, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 31.
16. A.M. Krstulovic, H. Colin, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 54 (1982) 2438.
17. D.P. Nowotnik, R.K. Narra, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3919.
18. M.S. Wainwright, C.S. Nieass, J.K. Haken, P.R. Chaplin, *J. Chromatogr.* 321 (1985) 287.

19. J.K. Haken, M.S. Wainwright, R.J. Smith, J. Chromatogr. 133 (1977) 1.
20. R.J. Laub, S.J. Madden, J. Liq. Chromatogr. 8 (1985) 173.
21. L. Didaoui, A. Touabet, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, W. Engewald, J. High Resol. Chromatogr. 22 (1999) 559.
22. M. Montes, J.L. Usero, A. del Arco, C. Izquierdo, J. Casado, J. Chromatogr. 481 (1989) 97.
23. W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, *Numerical Recipes in FORTRAN 77: The Art of Scientific Computing*, second edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992.
24. J.H. Knox, R. Kaliszan, J. Chromatogr. 349 (1985) 211.
25. E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 299 (1994) 219.



## Capítulo 3

### **Método de regresión iterativo alternante para la estimación del tiempo muerto a partir de diseños experimentales**

#### **3.1. Resumen**

Se propone un método indirecto para la estimación del tiempo muerto ( $t_0$ ), en cromatografía líquida en fase inversa, basado en una relación entre el tiempo de retención y el contenido de disolvente orgánico. El método procesa los datos de retención obtenidos en diseños experimentales. Para lograr una validez más general e incrementar la exactitud, se utilizó simultáneamente la información de varios compuestos, en un proceso de regresión alternante. Se aplicó el método a grupos de nitrosaminas, alquilbencenos, fenoles, derivados bencénicos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y  $\beta$ -bloqueantes, entre otros compuestos, cromatografiados en una columna ciano y diferentes columnas C18. El método se validó comparando los resultados con los proporcionados por la inyección de marcadores, la observación del frente del disolvente y el método de la serie homóloga. Se encontró, además, que diferentes grupos de compuestos, eluidos en una misma columna, apuntaban al mismo valor de  $t_0$ , lo que se verificó para diferentes ventanas de composición de disolvente orgánico. El método permite la mejora de modelos útiles con fines de optimización o para otros propósitos, ya que  $t_0$  puede estimarse a partir de los datos de retención de los mismos compuestos que interesa estudiar.

### 3.2. Introducción

Se han propuesto diversas definiciones de volumen muerto en cromatografía líquida en fase inversa (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC). La más directa es “la diferencia entre el volumen del tubo de la columna vacío y el volumen que ocupa el material que rellena la columna”. Esta definición considera, por lo tanto, el volumen interpartícula e intrapartícula, a lo que debe añadirse el volumen extra-columnar. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que la fase estacionaria adsorbe una pequeña cantidad de disolvente orgánico [1], reduciendo así el volumen entre el inyector y el detector. Además, las moléculas de los solutos pueden quedar excluidas parcialmente de los poros de la fase estacionaria. De acuerdo a ello, una definición más apropiada de volumen muerto es “el volumen de fase móvil que rellena el espacio entre el inyector y la celda del detector, accesible a los solutos durante su elución cromatográfica” [2–4]. Relacionado con el concepto de volumen muerto se halla el de tiempo muerto, que se define como “el tiempo que necesita un compuesto que no interacciona con la fase estacionaria para recorrer la distancia que hay entre el inyector y el detector, cuando se eluye a flujo constante” [5,6].

La implementación del método que mide la diferencia entre la columna vacía y la columna rellena con fase estacionaria requiere instrumentos específicos y una gran cantidad de tiempo, por lo que es poco práctico para su uso rutinario. De ahí que se hayan propuesto métodos más simples para determinar el volumen muerto. El tema es complejo debido a que los métodos utilizados no son del todo adecuados a cada definición, y suponen incertidumbres experimentales no despreciables. Además, los resultados obtenidos difieren porque cada método mide una propiedad diferente. La discusión y controversia se han mantenido vivas durante décadas, lo que ha dado lugar a varios artículos de revisión [2,4,5,7–10].

Se han clasificado los métodos publicados como estáticos y dinámicos. En los métodos estáticos no existe flujo y la columna se mantiene a presión atmosférica. El más usual es el método picnométrico, que consiste en pesar sucesivamente la columna cromatográfica rellena con dos disolventes de densidad distinta [11]. Este método tiene asociado un error experimental apreciable derivado de la medida de una magnitud pequeña a partir de la sustracción del peso de la columna rellena con cada disolvente.



Además, ignora la solvatación de la fase estacionaria por los componentes de la fase móvil [4].

En los métodos dinámicos, la fase móvil fluye y existe un gradiente de presión lineal a lo largo de la columna. En el llamado “método de la primera perturbación”, se obtiene un pico al inyectar un componente de la fase móvil (agua o disolvente orgánico), o una disolución con una composición ligeramente distinta a la de la fase móvil. El resultado depende, sin embargo, de las condiciones experimentales [4]. Otro método extendido, debido a su simplicidad práctica, consiste en la inyección de marcadores no retenidos que absorben en el UV, pero no es fácil encontrar compuestos ideales que cumplan estas condiciones [4].

La retención de los miembros consecutivos de una serie homóloga proporciona un método indirecto, que obvia las dificultades asociadas a la selección de compuestos no retenidos. El método se basa en la supuesta relación lineal entre el logaritmo del factor de retención y el número de carbonos de los homólogos, y extrapola el tiempo de retención para un compuesto que no posee átomos de carbono [4,8,12]. Es un método más largo de aplicar que los métodos dinámicos descritos anteriormente, requiere datos con una precisión y exactitud elevada, y la supuesta relación lineal debe ser válida a lo largo de toda la serie. Se necesitan los datos de al menos cuatro homólogos, que deben ser solubles en la fase móvil y exhibir propiedades de retención y detección adecuadas para su medida.

En este capítulo, se propone un nuevo método matemático para la estimación del tiempo muerto. El método procesa los tiempos de retención de dos o más compuestos, correspondientes a un diseño experimental realizado con propósitos de optimización, o para otros fines. Esto significa que para evaluar el tiempo muerto, el método propuesto puede hacer uso de los mismos compuestos para los cuales se necesita conocer el tiempo muerto, sin necesidad de utilizar compuestos externos a la serie. Los resultados se validaron comparándolos con los obtenidos a partir de la inyección de marcadores, la medida del pico refractométrico del frente de eluyente y el método estándar de la serie homóloga. También se realizó una validación interna a partir de los datos de retención para distintos grupos de compuestos y ventanas de composición de fase móvil.

### 3.3. Parte experimental

#### 3.3.1. Compuestos de prueba y condiciones experimentales

A fin de comprobar la aplicabilidad general del nuevo método propuesto en este trabajo para la estimación del tiempo muerto, se utilizaron varias series de datos obtenidos en nuestro laboratorio para este trabajo, junto con datos procedentes de nuestra base de datos, o publicados por otros autores. Algunos resultados correspondían a series homólogas, y también se procesaron de acuerdo al método de la serie homóloga para validar el resultado. Se consideraron los siguientes conjuntos de compuestos (se indica la columna y las condiciones experimentales utilizadas):

- (i) Nitrosaminas (número de átomos de carbono,  $n_C$ ): (1) *N*-nitrosodimetilamina ( $n_C = 2$ ), (2) *N*-nitrosometiletilamina ( $n_C = 3$ ), (3) *N*-nitrosometil-*n*-propilamina ( $n_C = 4$ ), (4) *N*-nitrosometil-*n*-butilamina ( $n_C = 5$ ), (5) *N*-nitrosodi-*n*-propilamina ( $n_C = 6$ ), (6) *N*-nitroso-*n*-propil-*n*-butilamina ( $n_C = 7$ ), (7) *N*-nitrosodi-*n*-butilamina ( $n_C = 8$ ). Se utilizó una columna ciano Spherisorb S5CN (100×4.6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Phase Separations, Deeside, Reino Unido), y acetonitrilo o metanol en los intervalos 20–55% (20, 25, 30, 35, 40, y 45%) y 30–60% (30, 35, 40, 45, 50, 55, y 60%) (v/v), respectivamente [13].
- (ii) Alquilbencenos: (1) tolueno (Scharlau, Barcelona), (2) etilbenceno (Acros Organics, Geel, Bélgica), (3) propilbenceno (Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), (4) butilbenceno (Acros Organics), y (5) pentilbenceno (Fluka, Buchs, Suiza). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×4.6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, Agilent, Waldbronn, Alemania), y la elución se llevó a cabo con mezclas de acetonitrilo-agua sin tamponar, en el intervalo 50–100% (50, 60, 70, 80, 90 y 100%).
- (iii) Se utilizaron varios compuestos como marcadores de tiempo muerto en intervalos específicos de composición de la fase móvil: acetona (Scharlau), ácido benzoico (Probus, Barcelona), *N,N*-dimetilformamida, ácido pícrico (Panreac, Barcelona), floroglucinol dihidratado, y ácido 2-nitrobenzoico (Acros Organics). Las disoluciones inyectadas se prepararon en un volumen de fase móvil y se eluyeron a través de la columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (la misma que se utilizó para los alquilbencenos). Se utilizaron mezclas de acetonitrilo-agua en el

intervalo 0–100% (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 89.5, y 100%), tamponadas a pH 3 con ácido cítrico monohidratado (Panreac) y NaOH (Scharlau).

- (iv) Fenoles: (1) fenol, (2) 4-nitrofenol, (3) 3-nitrofenol, (4) 2-metilfenol, (5) 2-clorofenol, (6) 2,4-dinitrofenol, (7) 2-nitrofenol, (8) 3-clorofenol, (9) 3-bromofenol, (10) 4-bromofenol, (11) 4-clorofenol, (12) 2,4-dimetilfenol, (13) 2,6-diclorofenol, (14) 4-cloro-3-metilfenol, (15) 2,4-diclorofenol, (16) 3,5-diclorofenol, (17) 2,4,6-triclorofenol, y (18) pentaclorofenol. Se utilizó una columna Lichrospher 100 RP-18 (250×4.0 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Merck, Darmstadt, Alemania), y fases móviles de acetonitrilo-agua y metanol-agua en el intervalo 0–100% (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) [14]. Con el fin de evitar la ionización, todas las fases móviles se tamponaron con ácido acético 0.1 M.
- (v) Compuestos aromáticos: (1) Benceno, (2) nitrobenceno, (3) tolueno, (4) bromobenceno, (5) etilbenceno, (6) clorobenceno, (7) naftaleno, (8) *p*-xileno, (9) propilbenceno, (10) bifenilo, (11) butilbenceno, (12) antraceno, (13) pireno, y (14) criseno. Se utilizó una columna Lichrospher 100 RP-18 (la misma que se utilizó para los fenoles) y fases móviles de acetonitrilo-agua y metanol-agua en el intervalo 0–100% (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%), en medio neutro [14].
- (vi) β-Bloqueantes: (1) practolol (ICI-Farma, Madrid), (2) atenolol (Zeneca Farma, Madrid), (3) sotalol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), (4) carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona), (5) pindolol (Sigma), (6) nadolol (Squibb, Esplugues de Llobregat, Barcelona), (7) acebutolol (Italfármaco, Alcobendas, Madrid), (8) celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón, Madrid), (9) esmolol (Polfa, Starogard, Polonia), (10) metoprolol (Ciba-Geigy, Barcelona), (11) bisoprolol (ICI-Farma), y (12) timolol (Merck, Sharp & Dohme, Madrid). Se utilizó una columna Spherisorb ODS-2 no protegida (125×4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Scharlau) y fases móviles de acetonitrilo y metanol en los intervalos 20–60% (20, 25, 30, 40 y 60%) y 40–60% (40, 45, 50, 55 y 60%), respectivamente.
- (vii) Derivados de *o*-ftaldialdehído y *N*-acetilcisteína (OPA/NAC, Fluka) de arginina, lisina (Fluka), glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, y

triptófano (Guinama, Valencia), preparados con un exceso del reactivo derivatizante pre-columna, y eluidos con una columna Inertsil ODS-3 (250×4.6 cm, 5 µm de tamaño de partícula, Análisis Vínicos, Ciudad Real), con acetonitrilo en el intervalo 5–27.5% (5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0 y 27.5%).

Para la columna Zorbax Eclipse XDB-C18, se utilizaron los siguientes compuestos como marcadores del tiempo muerto: KBr (Prolabo, Fontenay-sous-bois, Francia), KI (Guinama, Valencia), tartrazina, urea (Panreac), tiourea (Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.), y uracilo (Acros Organics). Se comprobó que estos compuestos no eran retenidos en el intervalo de acetonitrilo 10–90%.

### **3.3.2. Instrumentación y software**

Las medidas experimentales llevadas a cabo en nuestro laboratorio se realizaron con sistemas cromatográficos que constaban de una bomba isocrática, un muestreador automático, un controlador de la temperatura (Agilent, Series 1100 o 1200, Waldbronn, Alemania) y un detector UV-visible de onda variable (Serie 1100), todos ellos gobernados por una estación de datos HPChemStation B.02.01 (Agilent). El flujo y el volumen de inyección se fijaron a 1 ml min<sup>-1</sup> y 5 µl, y la temperatura se mantuvo constante a 25°C. Se realizaron inyecciones triplicadas. Las señales se monitorizaron a 254 nm, con excepción del KBr y la urea, que se midieron a 207 nm.

El tiempo muerto extra-columnar se midió por inyección triplicada de seis compuestos (acetona, *N,N*-dimetilformamida, pentilbenceno, tartrazina, tolueno y uracilo) en el sistema cromatográfico sin columna, siendo  $t_{\text{ext}} = 0.0912 \pm 0.0014$  min.

El tratamiento de los datos se llevó a cabo con rutinas escritas en MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, EE.UU.), o programadas en Visual Basic 6.0 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EE.UU.).

### 3.4. Tratamiento de los datos

La retención en RPLC para un soluto  $i$  puede expresarse en términos de parámetros de solubilidad de la siguiente forma [15]:

$$\log k_i = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0} = \frac{V_i}{RT} [(\delta_m - \delta_i)^2 - (\delta_s - \delta_i)^2] + \log \frac{n_s}{n_m} \quad (3.1)$$

donde  $k_i$  es el factor de retención,  $t_{Ri}$  el tiempo de retención,  $t_0$  el tiempo muerto,  $R$  la constante de los gases ideales ( $1.9865 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura absoluta (K),  $v_i$  el volumen molar del soluto ( $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ),  $\delta$  el parámetro de solubilidad ( $\text{cal}^{0.5} \text{ cm}^{-1.5}$ ), y  $n$  el número de moles de fase estacionaria (s) o móvil (m) presentes en la columna. Para una mezcla binaria de agua (w) y un modificador orgánico (o):

$$\delta_m = (1 - \varphi) \delta_w + \varphi \delta_o \quad (3.2)$$

siendo  $\varphi$  la fracción volumétrica de disolvente orgánico. Si se sustituye la Ecuación (3.2) en la Ecuación (3.1), se obtiene una relación cuadrática entre el logaritmo del factor de retención,  $k$ , y la fracción volumétrica de disolvente orgánico en la fase móvil acuo-orgánica:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \varphi^2 \quad (3.3)$$

donde los parámetros  $c_0$ – $c_2$  recogen las constantes y las propiedades soluto/fase móvil/fase estacionaria indicadas en las Ecuaciones (3.1) y (3.2). A continuación, sólo consideraremos esta ecuación simplificada.

En intervalos de disolvente orgánico restringidos, puede despreciarse el término cuadrático [16]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi \quad (3.4)$$

A partir de la definición de factor de retención:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.5)$$

y de la Ecuación (3.4), se obtiene:

$$t_R = t_0 (1 + k) = t_0 (1 + k_0 e^{c_1 \varphi}) \quad (3.6)$$

Los parámetros  $t_0$ ,  $k_0$  y  $c_1$  pueden calcularse mediante regresión no lineal, ajustando los tiempos de retención ( $t_R$ ) obtenidos a diversas composiciones de fase móvil. Comprobamos que la Ecuación (3.6) escrita como sigue:

$$t_R = t_0 + e^{a+b\varphi} \quad (3.7)$$

donde  $a$  y  $b$  son parámetros de ajuste, muestra una convergencia más favorable.

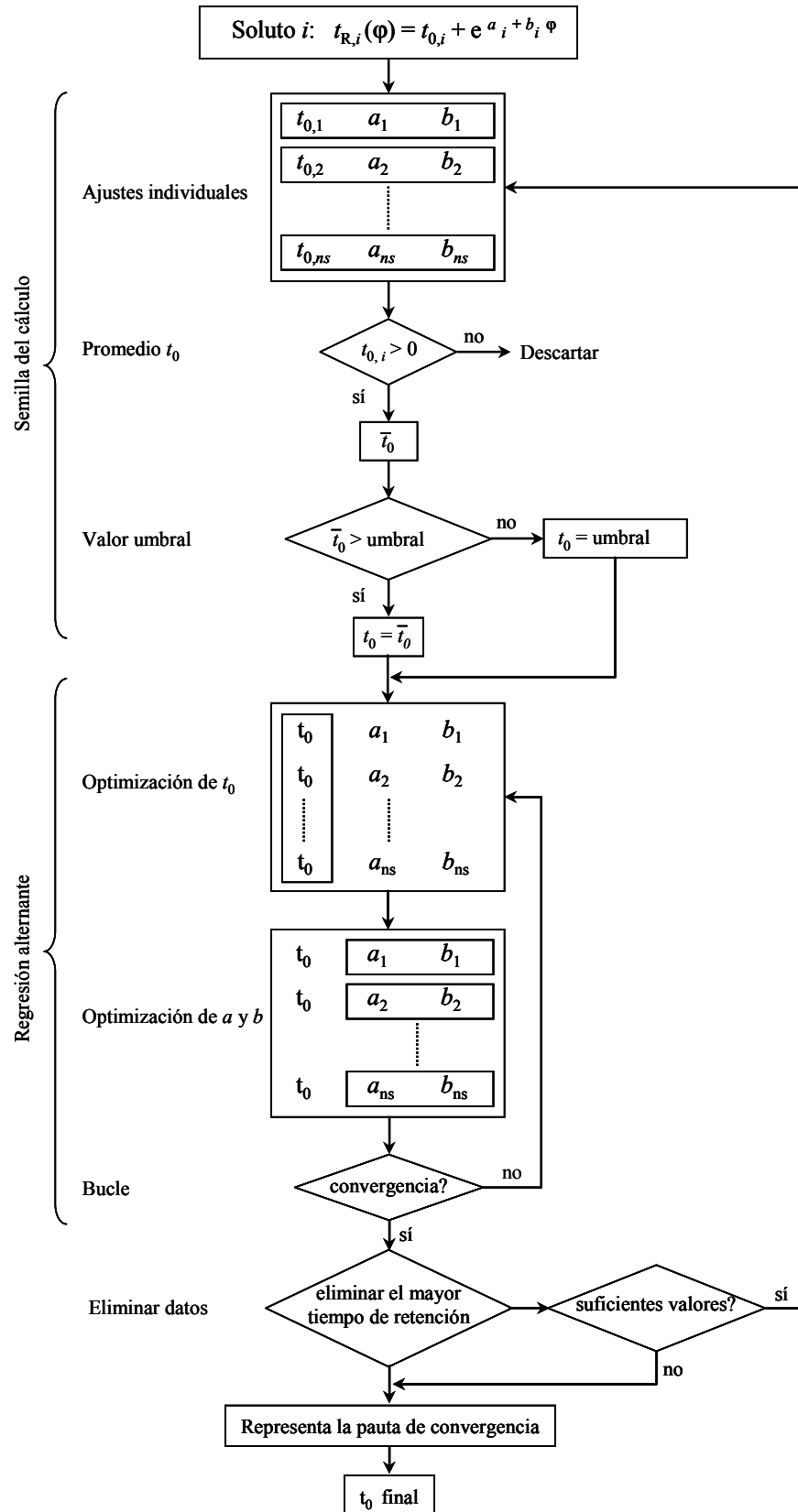
Los ajustes no lineales de la Ecuación (3.7) para obtener los parámetros del modelo  $t_0$ ,  $a$  y  $b$ , se efectuaron aplicando el método de Powell, que es robusto y permite una convergencia rápida a partir de estimaciones iniciales distantes. Evidentemente, los ajustes no lineales pueden realizarse mediante otros métodos (e.g. simplex, Davidon-Fletcher-Powell, Rosenbrook, Levenberg-Marquardt, etc.). Los detalles de estos métodos quedan fuera del propósito de este capítulo, pero se pueden encontrar explicaciones muy detalladas en la Ref. [17]. Los ajustes no lineales pueden también implementarse fácilmente en Excel Solver.

La Ecuación (3.7) puede modificarse incluyendo cualquier relación que convenga entre el factor de retención y la composición de la fase móvil, sustituyendo el término  $k$  de la Ecuación (3.6) por la relación deseada (como por ejemplo la Ecuación (3.3), u otras ecuaciones basadas en los parámetros de polaridad [18]).

En principio, es fácil pensar que la Ecuación (3.7) puede utilizarse para estimar el valor de  $t_0$  mediante la regresión de los tiempos de retención de solutos individuales frente a la composición de la fase móvil. Sin embargo, como mostraremos en la siguiente sección, los valores de  $t_0$  obtenidos de este modo se ven afectados de una gran incertidumbre. Supongamos un conjunto de  $ns$  solutos para los que disponemos de sus correspondientes tiempos de retención para diversas composiciones de fases móvil. Si se ajusta la Ecuación (3.7) independientemente para cada soluto, se obtendrán  $ns$  conjuntos de valores:  $t_{0,1}$ ,  $a_1$  y  $b_1$  para el primer soluto,  $t_{0,2}$ ,  $a_2$  y  $b_2$  para el segundo, ... y  $t_{0,ns}$ ,  $a_{ns}$  y  $b_{ns}$  para el soluto  $ns$ . Idealmente, las estimaciones del tiempo muerto  $t_{0,1}$ ,  $t_{0,2}$ , ... y  $t_{0,ns}$  deberían coincidir, pero esto no es lo que ocurre en la práctica. Es posible que uno (o más) soluto(s) proporcionen el tiempo muerto correcto, pero el analista no podrá tomar una decisión en este sentido. Además, en algunos casos pueden obtenerse incluso valores negativos para algunos solutos.

Con el fin de mejorar la precisión y la exactitud de  $t_0$ , extrayendo todo el provecho posible de la Ecuación (3.7) con resultados significativos, se propone aquí un método capaz de procesar la información de todo el conjunto de  $ns$  solutos, en iteraciones anidadas que incluyen etapas de regresión alternantes. El algoritmo tiene como objetivo encontrar un valor común de  $t_0$  capaz de predecir con la máxima exactitud los tiempos de retención de los  $ns$  solutos en cada condición experimental. A continuación, se describe el algoritmo propuesto (véase también la Figura (3.1)):

- (i) Antes de iniciar las iteraciones, es conveniente disponer de una estimación inicial de  $t_0$ . De ahí que la primera etapa del algoritmo sea el cálculo del conjunto de  $ns$  valores de  $t_0$ ,  $a$  y  $b$  (un conjunto por cada soluto), mediante el ajuste no lineal de los tiempos de retención frente a la composición de la fase móvil para cada soluto de acuerdo a la Ecuación (3.7). Los  $ns$  valores de tiempo muerto obtenidos ( $t_{0,1}$ ,  $t_{0,2}$ , ...,  $t_{0,ns}$ ) se promedian, sujetos a la condición de que sólo se consideran los valores positivos. Si la media del tiempo muerto ( $\bar{t}_0$ ) queda por debajo de un valor umbral arbitrario (e.g. 0.5 min, que es un valor inaceptablemente bajo para  $t_0$  cuando se trabaja con una columna de RPLC de 150×4.6 mm a 1 ml min<sup>-1</sup>),  $\bar{t}_0$  se sustituye por el valor umbral. Ello permite que la convergencia avance en la dirección correcta más rápidamente a lo largo de las iteraciones, excluyendo de manera gradual soluciones inadecuadas, incluso en los casos en los que las estimaciones iniciales posean sesgos elevados.
- (ii) En este punto se dispone de un valor no optimizado (aunque común a todos los solutos) de  $t_0$  ( $\bar{t}_0$  o el valor umbral), y  $ns$  conjuntos de los parámetros  $a$  y  $b$  de la Ecuación (3.7) ( $a_1$  y  $b_1$  para el primer soluto,  $a_2$  y  $b_2$  para el segundo, ... y  $a_{ns}$  y  $b_{ns}$  para el soluto  $ns$ ). Este valor de  $t_0$  se refina a lo largo del algoritmo. Con este propósito, se fijan los parámetros  $a$  y  $b$  de cada soluto y se calcula un valor común de  $t_0$ , que describe toda la información del diseño experimental (i.e. los tiempos de retención de todos los solutos y fases móviles, que dan lugar a un valor mínimo de la suma de los cuadrados de los residuos, SSR). El  $t_0$  mejorado reemplaza al valor anterior de  $t_0$  (o al valor umbral).



**Figura 3.1.** Diagrama de flujo ilustrando las etapas del método de regresión iterativo alternante.



- (iii) Cada soluto se ajusta de nuevo individualmente (esta vez manteniendo invariable el valor mejorado de  $t_0$  obtenido en la etapa (ii)), para obtener valores refinados de  $a$  y  $b$ , específicos para cada soluto ( $a_1$  y  $b_1$  para el primer soluto,  $a_2$  y  $b_2$  para el segundo, ... y  $a_{ns}$  y  $b_{ns}$  para el soluto  $ns$ ). Puesto que se fija el valor de  $t_0$ , la Ecuación (3.7) puede linearizarse:

$$\ln(t_R - t_0) = a + b\varphi \quad (3.8)$$

permitiendo un ajuste más directo.

- (iv) Se mantienen ahora constantes los valores de  $a$  y  $b$ , y se busca un valor mejor de  $t_0$  de acuerdo con la etapa (ii). Este proceso alternante de las etapas (ii) y (iii) se repite hasta que el valor de  $t_0$  converja en una solución coherente, manteniendo la condición descrita en la etapa (i) de que  $t_0$  sea superior al valor umbral. El proceso requiere un número variable de iteraciones, generalmente 300–1500, pero el proceso puede ser más lento en situaciones complejas (>5000 iteraciones).
- (v) El valor de tiempo muerto obtenido al terminar las iteraciones descritas en las etapas (i) a (iv) puede hallarse más o menos sesgado debido a la presencia de puntos niveladores (i.e. tiempos de retención demasiado alejados de  $t_0$ ). Por esta razón, el método continúa eliminando el mayor tiempo de retención de la serie de datos, y poniendo en marcha de nuevo el algoritmo con los datos restantes (etapas (i) a (iv)). La eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados da lugar a una pauta que apunta a la solución final. Dicha pauta posee un valor diagnóstico, como se verá más adelante. La eliminación secuencial de tiempos de retención también se aplicó al método de la serie homóloga, que se utilizó con propósitos de validación. Esta etapa de eliminación es esencial para el éxito de los dos métodos.

El procedimiento matemático es muy simple si se utiliza la Ecuación (3.7) linealizada (Ecuación (3.8)), pero ciertamente su implementación requiere algún conocimiento de programación, debido a los múltiples ajustes realizados y al cálculo iterativo.

Debe llamarse la atención sobre el hecho de que el método propuesto acepta de manera implícita que el tiempo muerto no se ve afectado significativamente por los cambios en la composición de la fase móvil, una hipótesis que ha sido sugerida por algunos autores [19,20]. Por supuesto, cuanto menor es el intervalo de concentraciones del disolvente orgánico, más válida es esta suposición. Para calibrar estos comentarios,

obsérvese los tiempos de retención para tres marcadores de tiempo muerto para la columna Zorbax Eclipse y fases móviles de acetonitrilo a las concentraciones 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80% (v/v): 1.45, 1.39, 1.34, 1.32, 1.31, 1.32 y 1.34 min para tiourea, 1.26, 1.22, 1.19, 1.17, 1.17, 1.19 y 1.21 min para KBr, y 1.43, 1.35, 1.30, 1.28, 1.28, 1.29 y 1.32 min para uracilo.

Nótese que el algoritmo propuesto se aplicó en intervalos de disolvente orgánico suficientemente estrechos, en los que la Ecuación (3.4) era válida y la variación eventual de  $t_0$  con la composición de la fase móvil debe ser mínima. Por otro lado, la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados contribuye a que se cumplan estas dos condiciones. El método asume, además, que la accesibilidad de los  $n$ s solutos a los poros de la fase estacionaria es similar.

### 3.5. Resultados y discusión

Durante el desarrollo de este capítulo, examinamos varias relaciones entre  $\log k$  y el contenido de disolvente orgánico: lineal (Ecuación (3.4)) y cuadrática con  $\varphi$  (Ecuación (3.3)), o lineal/cuadrática con el parámetro de polaridad  $P_m^N$  [18]. Concluimos que las relaciones lineales eran las más convenientes en términos de grados de libertad, velocidad de cálculo, robustez y calidad de los resultados.

Se encontró que los valores de tiempo muerto estimados a partir de la Ecuación (3.7) de forma individual eran demasiado variables, viéndose fuertemente afectados por la magnitud de los tiempos de retención procesados. Así, por ejemplo, el tiempo muerto estimado al procesar la información obtenida para cada nitrosamina separada con la columna ciano, utilizando acetonitrilo en el intervalo 20–55% fue ( $t_0$  en min, ver el código del soluto en la sección experimental): (1)  $2.19 \pm 0.69$ , (2)  $2.16 \pm 0.41$ , (3)  $2.32 \pm 0.25$ , (4)  $2.60 \pm 0.14$ , (5)  $2.83 \pm 0.13$ , (6)  $3.08 \pm 0.13$ , y (7)  $3.31 \pm 0.13$ , y utilizando metanol en el intervalo 30–60%: (1)  $2.87 \pm 0.19$ , (2)  $2.97 \pm 0.11$ , (3)  $3.00 \pm 0.11$ , (4)  $3.10 \pm 0.12$ , (5)  $3.24 \pm 0.16$ , (6)  $3.39 \pm 0.09$ , y (7)  $3.64 \pm 0.12$ . Como se observa, cada soluto converge a un valor distinto de  $t_0$ , que se correlaciona positivamente con la hidrofobicidad del soluto. Estos valores se encuentran dispersos en el intervalo 2.19–3.31 para el acetonitrilo y 2.87–3.64 para el metanol, sin mostrar ninguna tendencia central.

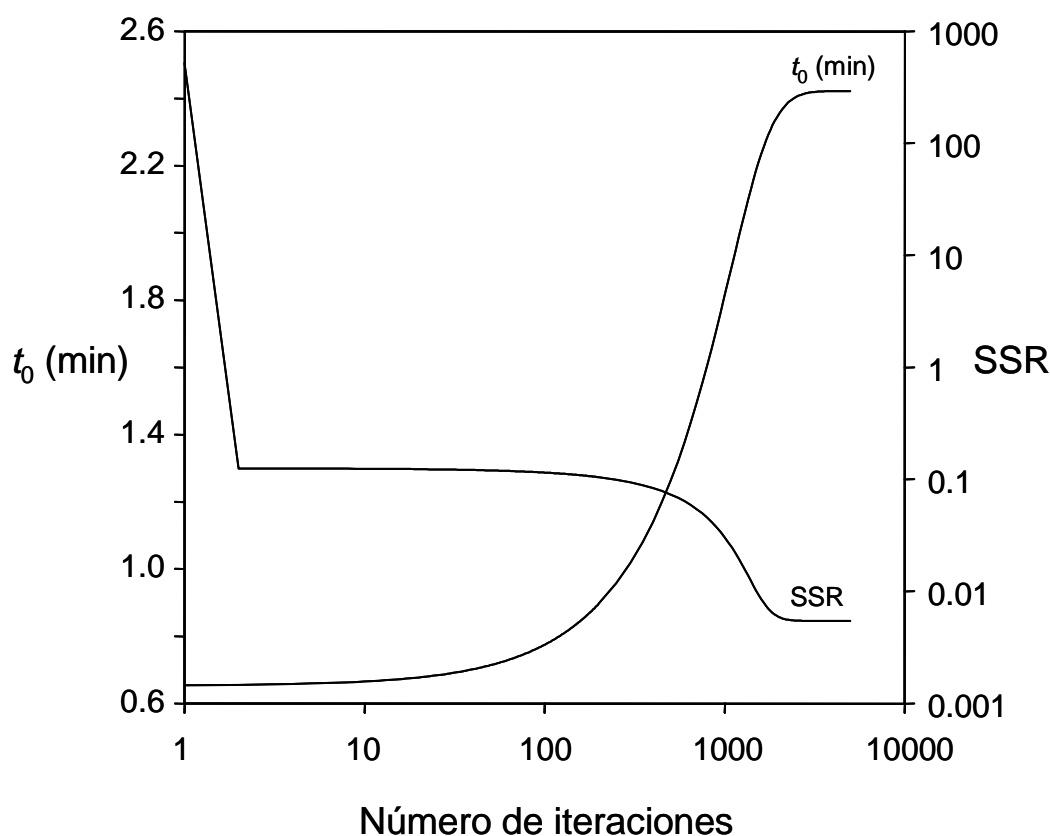
Tal resultado ilustra por qué este método no ha sido recomendado nunca para la estimación del tiempo muerto.

Tal y como mostraremos, el método de regresión iterativo alternante, que procesa los datos de retención de varios compuestos simultáneamente, supera todas las limitaciones anteriores. Apoyándose mutuamente, la información de un soluto se ve reforzada por la de otros solutos, incrementando así la fiabilidad de la estimación del tiempo muerto. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para varios conjuntos de compuestos.

### 3.5.1. Nitrosaminas

Utilizaremos esta aplicación particular para ilustrar cómo funciona el método. La Figura 3.2 muestra la progresión de las estimaciones de  $t_0$  a lo largo de las iteraciones (etapas (i)-(iv) en la Sección 3.4), cuando se aplicó el método al conjunto completo de nitrosaminas eluidas con metanol en el intervalo 30–60%, antes de proceder a la eliminación secuencial de los datos de retención (etapa (v)). Se representa la suma de los cuadrados de los residuos, a lo largo de las iteraciones (nótese que el eje de abscisas está contraído logarítmicamente). Como puede observarse, cuando SSR se estabiliza,  $t_0$  alcanza un valor constante.

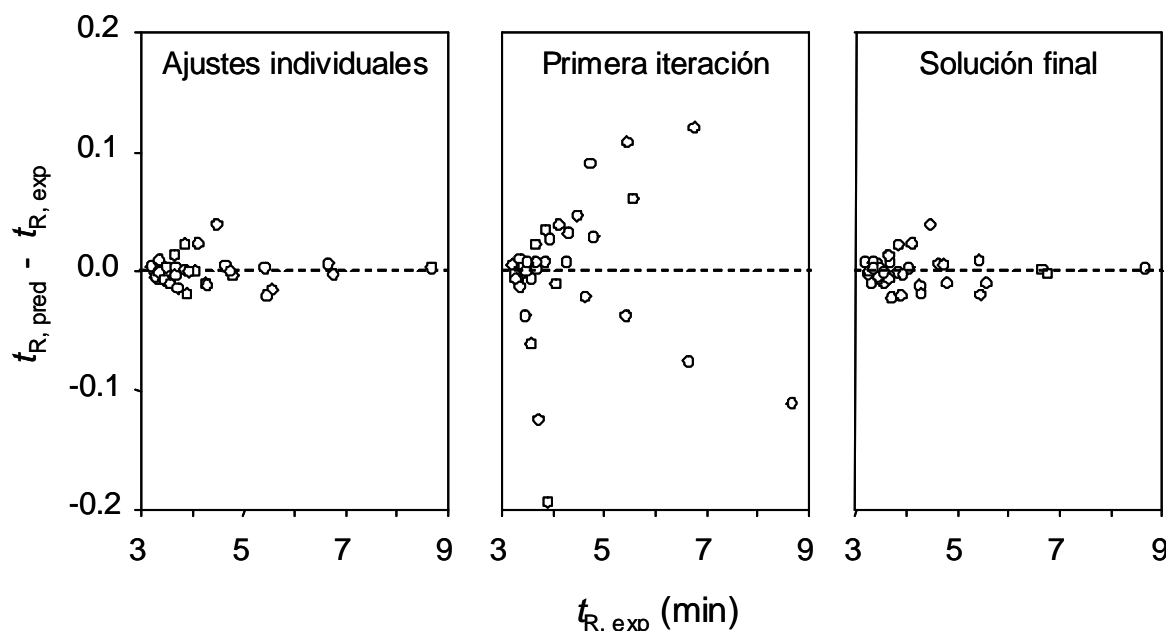
En algunos casos, el ajuste individual para cada soluto del conjunto (etapa (i)) arrojó resultados muy sesgados y poco consistentes entre sí, dando lugar a un valor promedio de  $t_0$  altamente sesgado. El método de regresión iterativo alternante refina esta estimación inicial aproximada. Seleccionamos el ejemplo de la Figura 3.2 para ilustrar que, incluso partiendo de un valor inicial (semilla) con un error elevado ( $t_0 = 0.6$  min), el método es capaz de converger en una estimación aceptable del tiempo muerto ( $t_0 = 2.42$  min), de acuerdo con los resultados proporcionados por métodos alternativos. Nos pareció también interesante mostrar un ejemplo de convergencia lenta. El número de iteraciones con otras series examinadas en este capítulo se situaba generalmente por debajo de 500–1000.



**Figura 3.2.** Proceso de convergencia durante la aplicación del método de regresión iterativo alterante, antes de realizar la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados, para las nitrosaminas eluidas con metanol en el intervalo 30–60%. Se muestra el cambio en las estimaciones del tiempo muerto y en la suma de los cuadrados de los residuos a lo largo de la aplicación del algoritmo (etapas (i)–(iv)).

La Figura 3.3 muestra, para el mismo ejemplo, las desviaciones absolutas tras aplicar individualmente la Ecuación (3.7) a cada soluto (diagrama izquierdo, primeras estimaciones de  $t_0$ , etapa (i)), tras completar la primera iteración del método de regresión alternante (diagrama central, etapa (ii)), y al final del proceso antes de la eliminación secuencial de los tiempos de retención mayores (diagrama derecho). Nótese que la calidad de las predicciones para la solución final es casi idéntica a la obtenida para los ajustes individuales, a pesar de haber forzado un valor común de  $t_0$  para todos los solutos (véase también la Tabla 3.1). El valor negativo para  $t_0$  obtenido en el ajuste individual de la nitrosamina de mayor polaridad es la razón del elevado error en las estimaciones

durante las primeras iteraciones, con una caída paralela en SSR (Figura 3.2). Ésta es también la razón de que la convergencia sea anormalmente lenta.



**Figura 3.3.** Exactitud en las predicciones del tiempo de retención (min) en la etapa (i), y al finalizar la etapa (ii) en la primera y última iteración mostradas en la Figura 3.1. Se representan los errores absolutos (diferencia entre los tiempos de retención predichos y los experimentales).

Tal y como se ha comentado, la inclusión de solutos lentos (i.e. con tiempos de retención alejados de  $t_0$ ) normalmente da lugar a sobreestimaciones del valor de tiempo muerto. Nótese que el método que proponemos es un método de extrapolación, y los datos alejados del origen pueden actuar como puntos niveladores, sesgando los resultados. Este mismo problema se encuentra en el método de la serie homóloga.

Observamos que los resultados ganaban coherencia al eliminar secuencialmente los tiempos de retención más elevados (etapa (v) en la Sección 3.3). A lo largo de los ciclos de eliminación, el valor estimado de  $t_0$  usualmente (pero no siempre) disminuyó, y finalmente se estabilizó. El proceso de eliminación puede aplicarse siempre que el número de datos sea suficiente para realizar las regresiones (i.e. tiempos de retención

**Tabla 3.1.** Parámetros de la Ecuación (3.7) a lo largo de la aplicación del método de regresión iterativo alternante para las nitrosaminas, separadas en una columna Spherisorb S5CN con 30-60 % de metanol, sin proceder a la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados.

Compuesto	Intervalo de		Ajustes individuales <sup>a</sup>		Fin de la primera iteración <sup>b</sup>		Solución final <sup>c</sup>	
	$t_R$ (min)	$t_0$ (min)	$a$	$b$	$t_0$ (min)	$a$	$t_0$ (min)	$b$
<i>N</i> -nitrosodimetilamina	3.19–3.59	–8.77	2.537	0.091	0.65	1.182	–0.414	–1.241
<i>N</i> -nitrosometiletilamina	3.27–4.07	1.56	1.178	–1.072	0.65	1.395	–0.727	–1.959
<i>N</i> -nitrosometil- <i>n</i> -propilamina	3.35–4.81	2.24	1.573	–2.448	0.65	1.684	–1.162	–2.804
<i>N</i> -nitrosometil- <i>n</i> -butilamina	3.45–6.24	2.35	1.302	–3.691	0.65	2.095	–1.801	–3.859
<i>N</i> -nitrosodi- <i>n</i> -propilamina	3.56–8.27	2.27	2.953	–4.512	0.65	2.570	–2.540	–4.860
<i>N</i> -nitroso- <i>n</i> -propil- <i>n</i> -butilamina	3.71–12.33	2.50	3.913	–6.219	0.65	3.184	–3.514	–6.032
<i>N</i> -nitrosodi- <i>n</i> -butilamina	3.89–19.71	2.43	4.763	–7.329	0.65	3.977	–4.774	–7.312

<sup>a</sup> Etapa (i) en la Sección 3.4.

<sup>b</sup> Primera vez que se aplica la etapa (ii).

<sup>c</sup> Solución final obtenida repitiendo las etapas (i) a (iv) hasta alcanzar la convergencia.

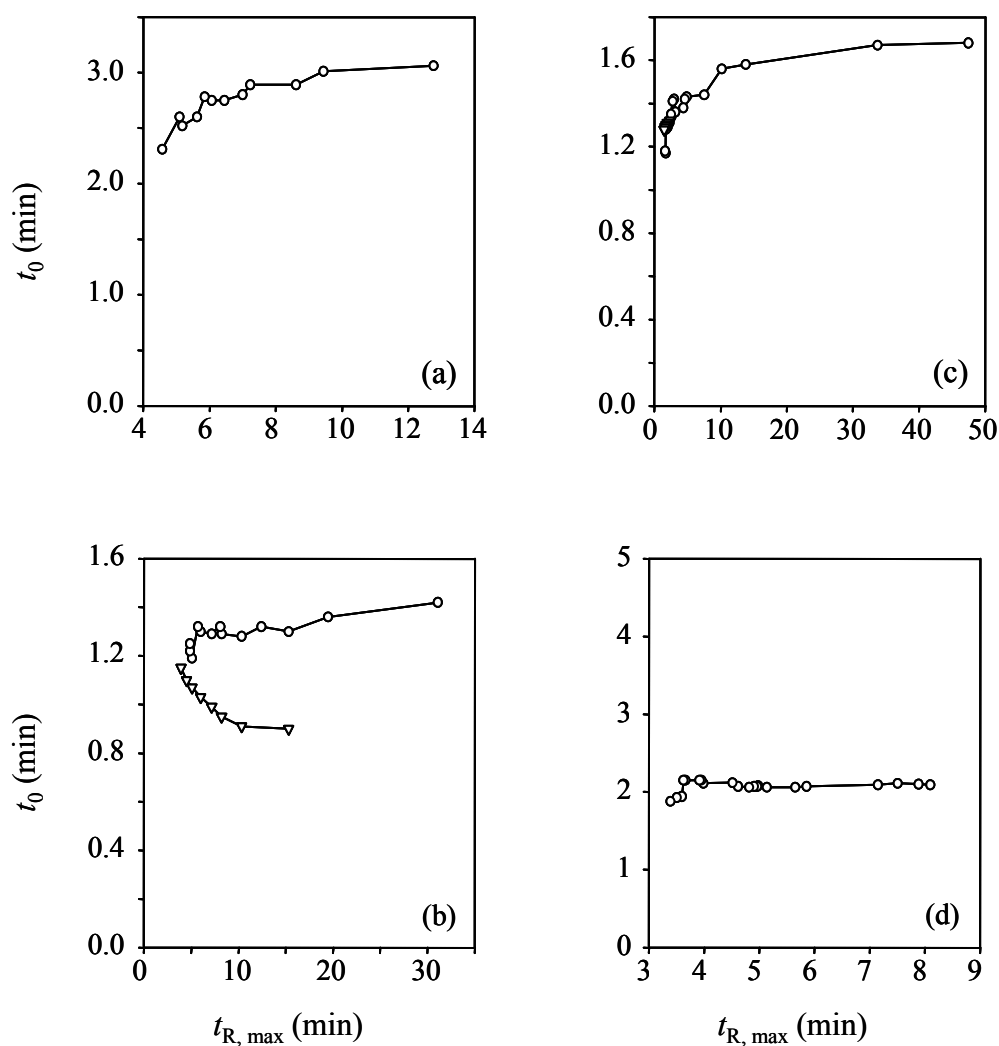
para al menos tres fases móviles para cada compuesto). Cuando los datos no incluyen suficiente información, se observa una fuerte disminución en el  $t_0$  estimado, advirtiendo sobre un resultado incierto que debería ser descartado.

La etapa (i) en la regresión iterativa alternante (Sección 3.4) es útil como herramienta de diagnóstico para detectar los solutos que poseen datos con una exactitud insuficiente (como la *N*-nitrosodimetilamina en la Tabla 3.1), que pueden descartarse antes de iniciar las iteraciones. Sin embargo, la eliminación de dichos datos no es imprescindible. Como se ha comentado, el coste es tan sólo una convergencia más lenta. Por otro lado, se podría pensar en la conveniencia de eliminar directamente los tiempos de retención que se hallen por encima de un cierto valor, antes de aplicar el método. Sin embargo, esto no permitiría controlar la convergencia del proceso, perdiéndose una herramienta de diagnóstico de gran valor. Puesto que el proceso completo sólo requiere unos pocos minutos, para un analista sin experiencia es más fácil procesar la matriz de datos completa (sin dejar de lado ningún dato), hasta alcanzar la solución final.

La Figura 3.4 muestra algunas tendencias representativas que se han observado a lo largo de los procesos de eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados. El valor final de tiempo muerto se obtuvo promediando aquellas estimaciones que cumplían la condición arbitraria  $t_{R,max} \leq 2t_0$ , pero cuando  $t_{R,max}$  en la última iteración era superior a  $2t_0$ , se promediaron los resultados de las cinco últimas iteraciones.

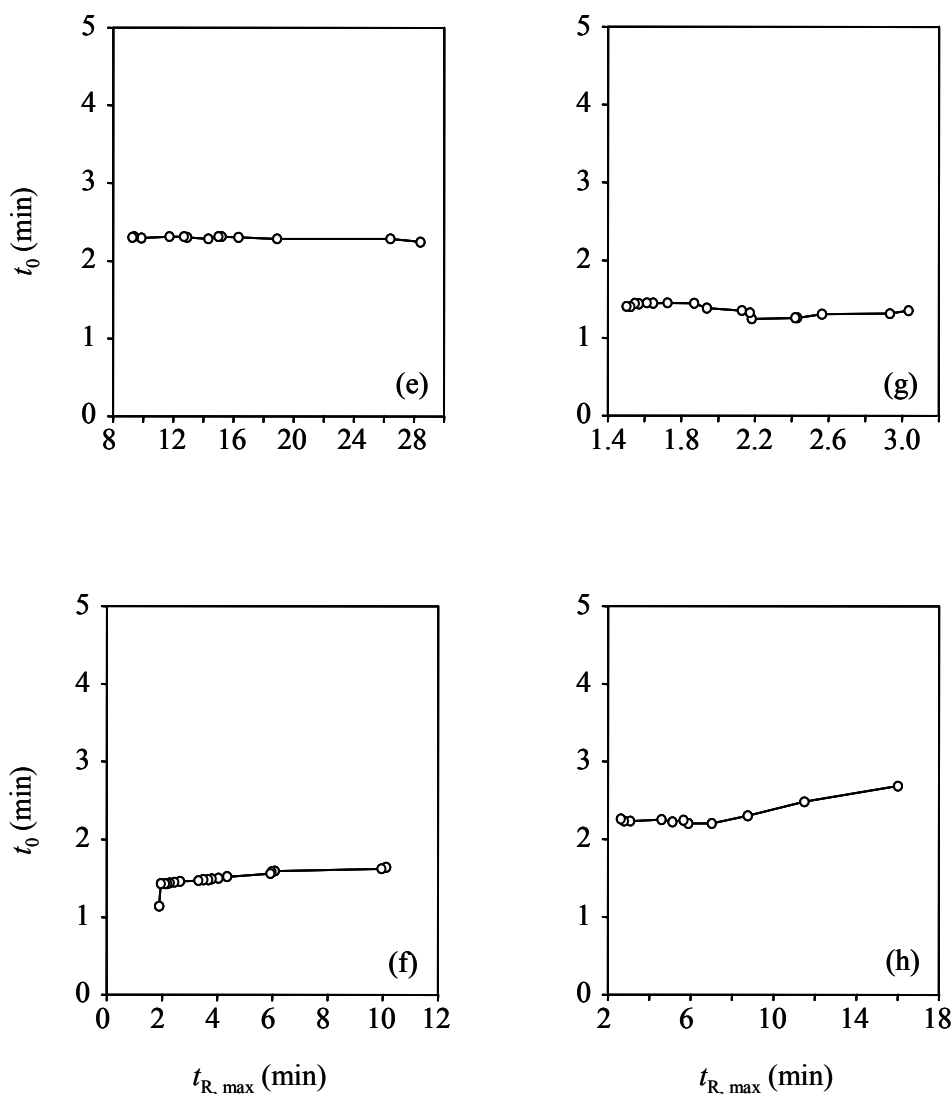
Los resultados para la serie de las nitrosaminas se proporcionan en la Tabla 3.2 para diferentes ventanas de la matriz de compuestos/composiciones de la fase móvil (véanse la primera y segunda columnas de la tabla). El tiempo muerto promedio para las nitrosaminas fue  $2.64 \pm 0.11$  min y  $2.89 \pm 0.08$  min para acetonitrilo y metanol, respectivamente.

El conjunto de nitrosaminas se procesó también utilizando el método de la serie homóloga (ver Capítulo 2), que proporcionó los siguientes resultados:  $2.62 \pm 0.13$  min y  $2.84 \pm 0.09$  min para acetonitrilo y metanol, respectivamente. Las estimaciones realizadas por Montes *et al.* [13] con el mismo conjunto de datos y el método de la serie homóloga con factores de ponderación, fueron:  $2.68 \pm 0.15$  min y  $2.90 \pm 0.04$  min, respectivamente.



**Figura 3.4.** Pautas de convergencia de las estimaciones del tiempo muerto obtenidas al aplicar el método de regresión iterativo alternante, realizando la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados,  $t_{R, \max}$  (se indica entre paréntesis la columna y la fase móvil): (a) 7 nitrosaminas (Spherisorb S5CN, 20–50% de acetonitrilo), (b) 5 alquilbencenos (○, Zorbax Eclipse XDB-C18, 60–100% de acetonitrilo) y (▽, 70–100% de acetonitrilo), (c) 3 marcadores retenidos apreciablemente (○, Zorbax Eclipse XDB-C18, 10–90% de acetonitrilo) y 3 marcadores retenidos ligeramente (▽, Zorbax Eclipse XDB-C18, 10–60% de acetonitrilo), (d) 7 fenoles (Lichrospher 100 RP-18, 70–100% de metanol).





**Figura 3.4 (continuación).** Pautas de convergencia de las estimaciones del tiempo muerto aplicando el método de regresión iterativo alternante, con eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados (se indica entre paréntesis la columna y la fase móvil): (e) 8 derivados bencénicos (Lichrospher 100 RP-18, 60–90% de acetonitrilo), (f) 8  $\beta$ -bloqueantes (Spherisorb ODS-2, 20–60% de acetonitrilo), (g) 6  $\beta$ -bloqueantes (Spherisorb ODS-2, 40–60% de metanol), y (h) 3 productos secundarios del OPA/NAC (Inertsil ODS-3, 7.5–27.5% de acetonitrilo).

**Tabla 3.2.** Tiempo muerto estimado (min) para las nitrosaminas (columna Spherisorb S5CN) y alquilbencenos (columna Zorbax Eclipse XDB-C18), utilizando el método de la regresión iterativo alternante, incluyendo la eliminación secuencial.

Compuestos <sup>a</sup>	Fase móvil (%, v/v)	$t_{R,max}$ <sup>b</sup> (min)	$t_0$ (min)
Nitrosaminas (acetonitrilo)			
1–7	20–55	5.9–12.8	2.65±0.04
1–7	30–55	5.9–7.2	2.525±0.017
1–6	20–55	5.9–8.6	2.74±0.13
Nitrosaminas (metanol)			
1–7	30–60	4.3–19.7	2.94±0.06
1–7	35–60	4.1–19.7	2.83±0.08
Alquilbencenos (acetonitrilo)			
1–5	50–100	4.9–46.7	1.32±0.07
1–4	50–100	4.5–46.7	1.33±0.07
1–3	50–100	3.9–26.8	1.33±0.06
1–5	60–100	5.7–31.1	1.305±0.015
1–5	70–100	3.9–15.3	1.07±0.06

<sup>a</sup> Véase la sección experimental.

<sup>b</sup> Tiempos de retención máximos en la matriz procesada, a lo largo de las etapas de eliminación secuencial.

### 3.5.2. Alquilbencenos

La Tabla 3.2 muestra también los resultados obtenidos para un conjunto de alquilbencenos, cromatografiados en nuestro laboratorio. El valor promedio del tiempo muerto obtenido para estos compuestos fue:  $1.32 \pm 0.01$  min (se descartó la estimación para los compuestos 1–5, eluidos en el intervalo 70–100% de acetonitrilo). Esta estimación se validó utilizando dos métodos independientes: (i) el método de la primera perturbación, que apareció a  $1.21 \pm 0.05$  min (valor promedio obtenido de los cromatogramas de los alquilbencenos eluidos en el intervalo 50–90% de acetonitrilo); y (ii) el tiempo muerto obtenido utilizando marcadores no retenidos, cromatografiados con la misma columna:  $1.29 \pm 0.07$  min.

### 3.5.3. Compuestos utilizados a menudo como marcadores del tiempo muerto

El método propuesto en este capítulo posee la ventaja de su aplicabilidad general. En el desarrollo del trabajo experimental, se midió la retención de 12 compuestos (orgánicos e inorgánicos) que se utilizan a menudo como marcadores del tiempo muerto, ya que no se retienen al menos a altos contenidos de disolvente orgánico en la fase móvil. Los tiempos de retención de estos compuestos se midieron a varias composiciones de fase móvil entre el 10 y el 90% de acetonitrilo. Se reconocieron tres grupos:

- (i) Marcadores apreciablemente retenidos (tiempos de retención en el intervalo 10–90% de acetonitrilo): ácido 2-nitrobenzoico (desde 7.52 a 1.46 min), ácido benzoico (33.7 a 1.53 min), y ácido pícrico (47.4 a 1.39 min).
- (ii) Marcadores con cambios mínimos en la retención en el intervalo 10–90% de acetonitrilo: dimetilformamida (desde 1.99 a 1.49 min), acetona (2.48 a 1.54 min), y floroglucinol (2.33 a 1.36 min).
- (iii) Marcadores con cambios no significativos en la retención en el intervalo 10–90% de acetonitrilo: KBr ( $1.23 \pm 0.06$  min), KI ( $1.33 \pm 0.07$  min), tartrazina ( $1.22 \pm 0.05$  min), tiourea ( $1.38 \pm 0.08$  min), uracilo ( $1.36 \pm 0.10$  min), y urea ( $1.22 \pm 0.06$  min). La repetibilidad de las medidas del tiempo de retención se obtuvo a partir de 10

inyecciones consecutivas de tartrazina ( $1.1599 \pm 0.0011$ ), y uracilo ( $1.2793 \pm 0.0002$ ), utilizando una fase móvil conteniendo 50% de acetonitrilo.

Los tiempos de retención de los compuestos en los dos primeros grupos se procesaron independientemente para estimar el tiempo muerto utilizando el método de regresión iterativo alternante. Los resultados fueron similares. Para el grupo (i), donde el intervalo de retención fue 1.39–47.4 min, se obtuvo  $t_0 = 1.303 \pm 0.025$  min, y para el grupo (ii), donde el intervalo fue 1.36–2.48 min,  $t_0 = 1.296 \pm 0.016$  min. Estos resultados también concuerdan con la media de la estimación del tiempo muerto obtenido mediante el promedio de los tiempos de retención de los seis marcadores no retenidos del grupo (iii):  $t_0 = 1.29 \pm 0.07$  min. Nótese que el valor estimado con el método propuesto para los alquilbencenos, que fueron cromatografiados con la misma columna, fue  $1.32 \pm 0.01$  min.

La Figura 3.4c ilustra la evolución de la eliminación secuencial de los tiempos de retención para los grupos (i) y (ii). Nótese que los datos del grupo (ii) ( $\nabla$ ) se hallan superpuestos a los del grupo (i) ( $\circ$ ).

#### **3.5.4. Compuestos involucrados en un diseño experimental de optimización**

El desarrollo de métodos sistemáticos en RPLC viene a menudo soportado por planteamientos que requieren diseños con un número reducido de experimentos a distintas composiciones de la fase móvil. A partir de estos datos, se construyen modelos que describen el comportamiento de separación de los compuestos en estudio. Para este fin, es necesario conocer el valor del tiempo muerto. El método propuesto permite su estimación utilizando los tiempos de retención de los mismos compuestos para los que se desea establecer modelos de retención, siempre que el diseño experimental incluya información suficiente para los compuestos poco retenidos y el intervalo de concentración del disolvente orgánico no sea demasiado amplio.

Aplicamos el método de regresión iterativo alternante a tres conjuntos de compuestos: fenoles, derivados bencénicos/PAHs, y  $\beta$ -bloqueantes, eluidos con acetonitrilo y metanol. Los datos de retención para estas series se utilizaron en publicaciones previas del grupo con fines de modelización de la retención y, eventualmente, en la optimización de la separación de varios subconjuntos de

compuestos [21,22]. Al igual que para las nitrosaminas, se procesaron diferentes ventanas de la matriz de solutos/composiciones. La Figura 3.4d–g ilustra algunos ejemplos del progreso de la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados para los distintos conjuntos de datos, y las Tablas 3.3 y 3.4 recogen las estimaciones finales. Las estimaciones promedio (considerando las diferentes ventanas experimentales) fueron:  $2.40 \pm 0.18$  min (acetonitrilo) y  $2.07 \pm 0.07$  min (metanol) para los fenoles,  $2.41 \pm 0.20$  min (acetonitrilo) y  $2.170 \pm 0.015$  min (metanol) para los bencenos/PAHs, y  $1.51 \pm 0.06$  min (acetonitrilo) y  $1.430 \pm 0.004$  min (metanol) para los  $\beta$ -bloqueantes. Debe indicarse que los fenoles y los bencenos/PAHs se cromatografiaron con la misma columna.

Como se observa en la Tabla 3.3, las estimaciones del tiempo muerto para los solutos 1–6 de la serie de fenoles, eluidos con 10–40% de acetonitrilo, y los solutos 1–5 de la serie de los bencenos/PAHs, eluidos con 40–70% de acetonitrilo, son notablemente mayores que las obtenidas para las otras ventanas. Esto debe atribuirse a los elevados tiempos de retención que poseen incluso los compuestos más rápidos en esas ventanas de la matriz de datos, que no pueden ser compensados a lo largo del algoritmo de eliminación secuencial. Para ventanas de tiempo apropiadas, los resultados son consistentes.

También se aplicó el método propuesto a una serie de cromatogramas de varios aminoácidos derivatizados con OPA/NAC y eluidos isocráticamente con acetonitrilo-agua. Debido a la gran dependencia de los tiempos de retención de los derivados de OPA/NAC con la polaridad de los aminoácidos, se necesitaron diferentes intervalos de composición de la fase móvil para conseguir tiempos de retención suficientemente cortos para todos los derivados. Por esta razón, los tiempos de retención disponibles para los derivados no resultaron adecuados para aplicar el método matemático, puesto que no se disponía de ventanas que ofrecieran una retención suficientemente baja para varios aminoácidos en al menos tres fases móviles. Sin embargo, los cromatogramas mostraron tres picos secundarios asociados al reactivo en un amplio intervalo de composiciones (desde 7.5 hasta 27.5% de acetonitrilo), con una retención baja ( $t_{R,max} < 5$  min). El tiempo muerto estimado con el método propuesto utilizando estos picos fue  $2.237 \pm 0.016$  min, mientras que el tiempo muerto obtenido a partir de la primera perturbación fue  $2.25 \pm 0.06$  min.

**Tabla 3.3.** Tiempo muerto estimado (min) para los fenoles, bencenos y PAHs (columna Lichrospher 100 RP-18), utilizando el método de regresión iterativo alternante, incluyendo la eliminación secuencial.

Compuestos <sup>a</sup>	Fase móvil (%, v/v)	$t_{R,max}^b$ (min)	$t_0$ (min)
Fenoles (acetonitrilo)			
1-6	30-60	5.2-14.2	2.22±0.08
1-6	10-40	22.2-79.2	4.5±0.6
1-10	60-100	3.7-4.5	2.247±0.009
11-18	70-100	4.2-8.5	2.529±0.0015
11-16	70-90	3.3-4.2	2.626±0.010
11-16	50-70	6.5-10.1	2.39±0.04
Fenoles (metanol)			
1-10	60-100	3.6-8.2	2.142±0.018
1-10	70-100	2.8-5.0	2.03±0.09
11-16	70-100	3.4-9.6	2.03±0.08
Derivados bencénicos y PAHs (acetonitrilo)			
1-6	70-100	4.2-7.8	2.28±0.04
4-11	60-90	9.3-28.4	2.302±0.007
1-5	40-70	9.3-49.8	2.64±0.12
Derivados bencénicos y PAHs (metanol)			
11-14	70-100	3.4-9.6	2.170±0.015

<sup>a</sup> Véase la sección experimental. <sup>b</sup> Tiempos de retención máximos en la matriz procesada, a lo largo de las etapas de eliminación secuencial.

**Tabla 3.4.** Tiempo muerto estimado (min) para los  $\beta$ -bloqueantes (columna Spherisorb ODS-2), utilizando el método de regresión iterativo alternante, incluyendo la eliminación secuencial.

Compuestos <sup>a</sup>	Fase móvil (%, v/v)	$t_{R,max}$ <sup>b</sup> (min)	$t_0$ (min)
Acetonitrilo			
1–7, 12	20–60%	2.0–10.1	1.440±0.011
1, 4–6	20–60%	2.5–6.0	1.55±0.06
4–10	30–100%	2.0–6.7	1.56±0.05
1,4,6	30–60	1.9–2.1	1.501±0.011
Metanol			
1–6	45–60	1.5–2.4	1.433±0.018
1–7	45–60	1.5–4.3	1.432±0.026
1–6	40–60	1.5–3.0	1.428±0.022
1–6	50–60	1.5–2.2	1.425±0.017

<sup>a</sup> Véase la sección experimental.

<sup>b</sup> Tiempos de retención máximos en la matriz procesada, a lo largo de las etapas de eliminación secuencial.

### 3.6. Conclusiones

Se propone un nuevo método matemático para la estimación del tiempo muerto, que hace uso de los tiempos de retención de cualquier tipo de compuestos, sin ningún requisito especial, excepto que éstos no deben encontrarse excesivamente retenidos en las condiciones de trabajo. El método se basa en una relación entre el factor de retención y la composición de la fase móvil para los compuestos retenidos. Por lo tanto, requiere de un intervalo de condiciones experimentales donde la retención de los compuestos ensayados varíe con la composición de la fase móvil, pero el tiempo muerto de la columna no se vea afectado de manera significativa.

El método de regresión iterativo alternante con eliminación secuencial permite el uso simultáneo de la información proporcionada a diversas composiciones de la fase móvil para varios solutos, compensando la falta de exactitud de algunos datos. Debe tenerse en cuenta que el tiempo muerto se obtiene por extrapolación. En consecuencia, las estimaciones vienen afectadas por la magnitud de los tiempos de retención ajustados. Ésta es la razón principal de las diferencias observadas en los tiempos muertos estimados con el método clásico de la serie homóloga para diversas composiciones de fase móvil, y entre solutos cuando se hace uso de la regresión entre los tiempos de retención y el contenido de disolvente orgánico. Idealmente, estos dos métodos deberían aplicarse a solutos que mostrasen una retención suficientemente baja (e.g.  $t_R < 5t_0$ ). Sin embargo, cuando la matriz de tiempos de retención incluye valores iniciales inapropiados, se consigue la convergencia a resultados consistentes cuando se realiza la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados.

En algunos casos, debido a la estrecha variabilidad de los tiempos de retención con la composición de la fase móvil o a la inexactitud de los tiempos de retención, los ajustes individuales de la Ecuación (3.7) originan fuertes sesgos al inicio del proceso iterativo, lo que produce una convergencia lenta. Este sesgo, sin embargo, puede compensarse a lo largo de las iteraciones, originando finalmente una estimación satisfactoria.

El método asume que “el volumen muerto medido es el espacio accesible a los solutos durante su elución cromatográfica”. Esta definición podría implicar que solutos diferentes lleven asociados tiempos muertos distintos. Sin embargo, las diferencias parecen ser insignificantes al menos cuando solutos de naturaleza similar eluyen en ventanas de retención razonablemente estrechas. El método debería aplicarse a intervalos



relativamente estrechos de concentración de disolvente orgánico, en las que la aproximación lineal (Ecuación (3.4)) es más correcta. Nótese que la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados disminuye el impacto de posibles cambios en la capa de solvatación con la composición de la fase móvil, y favorece la validez de la aproximación lineal.

El único requisito del método es la disponibilidad de datos de retención de dos o más compuestos para tres o cuatro composiciones de fase móvil. Requiere un conocimiento matemático básico y de programación. Sin embargo, puesto que no se necesita la interacción del usuario, una vez desarrollado el programa de aplicación, una persona sin entrenamiento especial puede hacerlo funcionar. El método basado en la Ecuación (3.7) puede implementarse fácilmente, ya que los únicos ajustes no lineales que requiere son los incluidos en la etapa (i). Los bucles en las etapas (ii) y (iii) implican regresiones lineales simples. Estos cálculos pueden incluso implementarse con una calculadora científica con programas instalados.

El método es adecuado con propósitos de optimización, ya que permite la estimación del tiempo muerto utilizando los tiempos de retención de los mismos compuestos que están siendo separados. Esto significa que los factores de retención podrán calcularse con un valor de tiempo muerto estimado considerando la accesibilidad de los compuestos en estudio, evitando así el uso de compuestos externos.

Se aplicó el nuevo método a varios conjuntos de compuestos, cromatografiados utilizando una columna ciano y varias columnas C18, con dimensiones y empaquetados distintos, haciendo uso de fases móviles de metanol-agua o acetonitrilo-agua. La consistencia de los resultados obtenidos en diferentes situaciones confirma la fiabilidad del algoritmo. El método se validó satisfactoriamente frente al método de la primera perturbación, la inyección de marcadores no retenidos, y el método de la serie homóloga. También se llevó a cabo una validación interna utilizando diferentes ventanas de la matriz compuestos/composiciones, conteniendo los valores de tiempo de retención.

El método podría ser útil para el estudio del tamaño del poro y del efecto del volumen en distintas columnas (con materiales empacados no porosos, materiales con diverso tamaño de poro, y con fases móviles especialmente modificadas), y en la comparación de materiales de empacado (polímeros orgánicos y sílica gel enlazada con similar hidrofobicidad, etc.).

### 3.7. Referencias

1. M.E. Montgomery, M.J. Wirth, *Anal. Chem.* 66 (1994) 680.
2. G. Gutnikov, L.B. Hung, *Chromatographia* 19 (1984) 260.
3. B.A. Bidlingmeyer, F.V. Warren Jr., A. Weston, C. Nugent, P.M. Froehlich, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 275.
4. C.A. Rimmer, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 219.
5. R.J. Smith, C.S. Nieass, M.S. Wainwright, *J. Liq. Chromatogr.* 9 (1986) 1387.
6. P. Overaa, *Lab. Pract.* 39 (1990) 25.
7. J. García Domínguez, J.C. Díez Masa, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 969.
8. G.E. Berendson, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga Puchony, J. Inczédy, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 1669.
9. M.S. Wainwright, J.K. Haken, *J. Chromatogr.* 184 (1980) 1.
10. A. Alhedai, D.E. Martire, R.P.W. Scott, *Analyst* 114 (1989) 869.
11. E.H. Slaats, J.C. Kraak, W.J.T. Brugman, H. Poppe, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 255.
12. H. Wätzig, S. Ebel, *Chromatographia* 31 (1991) 544.
13. M. Montes, J.L. Usero, A. del Arco, C. Izquierdo, J. Casado, *J. Chromatogr.* 481 (1989) 97.
14. M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 147.
15. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 107.
16. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 185 (1979) 179.
17. W.H. Press, B.P. Flannery, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, *Numerical Recipes in FORTRAN 77: The Art of Scientific Computing*, second edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992.
18. E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.
19. J.H. Knox, R. Kaliszan, *J. Chromatogr.* 349 (1985) 211.
20. L. Didaoui, A. Touabet, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, B.Y. Meklati, W. Engewald, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 559.
21. J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 886 (2000) 31.
22. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002) 109.

## Capítulo 4

### Estimación de la capacidad de pico en elución isocrática

#### 4.1. Resumen

La capacidad de pico (i.e. número máximo de picos resueltos en una ventana cromatográfica) es un concepto teórico de interés creciente, pero basado en una situación poco frecuente en la práctica. Los cromatogramas reales ofrecen generalmente distribuciones desiguales, con picos solapados y amplias zonas de línea base. Por ello, el número máximo de picos resueltos se debe determinar a partir de estimaciones. Con este propósito, se han publicado diversas ecuaciones planteadas de acuerdo a tres perspectivas: (i) el método intuitivo (para el que la capacidad de pico es el tamaño de la ventana de tiempo de retención medido en unidades de anchura de pico), que asume picos de igual anchura, y (ii, iii) los métodos de Giddings y Grushka, que consideran cambios en la anchura del pico con el tiempo de retención. En este capítulo, se discute el concepto de capacidad de pico y se sugieren tres nuevos métodos para su cálculo, basados en descripciones realistas de la forma de los picos cromatográficos. El primero de ellos se basa en el método de Grushka y considera las contribuciones de las varianzas de pico columnares y extra-columnares. El segundo se basa en el método de Giddings y asume picos asimétricos, en los que las semianchuras frontal y de cola dependen linealmente del tiempo de retención. La tercera ecuación, basada en el método intuitivo, utiliza la anchura de pico media obtenida mediante integración, en lugar del valor medio de varios picos representativos. Se comprobó la exactitud del método clásico de Giddings para picos ideales, de una modificación del método de Grushka que considera la variación de la anchura del pico a la mitad de su altura, y de los tres métodos propuestos, utilizando para ello cromatogramas sintéticos contruidos mediante la adición de picos reales. Los resultados demuestran que la variación de la eficacia (y no de la asimetría) es el factor relevante, al menos en los ejemplos estudiados. Por otro lado, la anchura del pico debería medirse a niveles de altura bajos (e.g. 10%) para tener en cuenta la deformación de los picos.

## 4.2. Introducción

Los analistas caracterizan un sistema cromatográfico de acuerdo a su capacidad para obtener una buena separación en un tiempo de análisis razonable, para lo cual no sólo deben tenerse en cuenta los tiempos de retención, sino también las anchuras de los picos. De acuerdo a ello, se ha estudiado a fondo los factores que controlan la retención y la anchura de pico en cromatografía. En los últimos años, la capacidad de pico se ha convertido en un parámetro útil para evaluar el potencial de separación global de un sistema cromatográfico. Inicialmente desarrollado para elución isocrática, el concepto de capacidad de pico ha llamado la atención especialmente en sistemas cromatográficos uni- y bi-dimensionales que hacen uso de elución en gradiente, especialmente para muestras que contienen muchos componentes, donde conseguir la resolución completa es problemático. Las recientes revisiones escritas por Neue [1] y los grupos de investigación de Carr y Rutan [2] son buenos ejemplos del creciente interés en la estimación de la capacidad de pico.

El concepto de capacidad de pico se basa en el hecho de que los picos de todas las columnas cromatográficas tienen una anchura finita, que viene determinada por el número de platos,  $N$ , y en consecuencia, sólo un número de picos limitado puede encajar en el intervalo de tiempo accesible. La capacidad de pico se define como el número máximo de picos resueltos (i.e. picos adyacentes situados exactamente a la distancia adecuada para garantizar una resolución satisfactoria), en una ventana de tiempo determinada [3]. Este concepto posee el interés de considerar la totalidad del espacio cromatográfico, utilizando información relacionada con la eficacia de la columna.

Debe llamarse la atención, sin embargo, sobre el hecho de que la capacidad de pico sólo es accesible mediante cálculo. Por lo tanto, es un concepto teórico. En el sentido considerado en la definición anterior, el número máximo de picos resueltos excede el que podría encontrarse en un cromatograma real. Los picos cromatográficos raramente se encuentran espaciados de forma regular (como ocurre, por ejemplo, para oligómeros de alcoholes grasos etoxilados [4]): algunos componentes comparten el mismo espacio en el cromatograma y los espacios vacíos son frecuentes. Inicialmente se demostró que la ventana cromatográfica necesaria para separar todos los componentes de una muestra, para un cierto nivel de probabilidad, se incrementa con el cuadrado del número de

componentes [5]. Más recientemente, se ha publicado una verificación experimental que ha dado lugar a una modificación de esta hipótesis [1].

En vista de los resultados publicados, merece aún la atención la búsqueda de un algoritmo apropiado que permita la estimación de la capacidad de pico en cualquier situación. Los métodos publicados asumen picos ideales, y a menudo, las anchuras de pico o las eficacias se consideran invariables con el tiempo de retención [6–13]. A continuación, se discute con gran detalle los métodos publicados, y se sugieren nuevas perspectivas para la estimación de la capacidad de pico, en las que se consideran cambios en la anchura y la asimetría del pico con el tiempo de retención. Para comprobar la exactitud de los nuevos métodos, se han utilizado los datos cromatográficos de varios conjuntos de compuestos eluidos isocráticamente en cromatografía líquida en fase inversa hidro-orgánica y micelar.

### 4.3. Métodos para estimar la capacidad de pico

En las Secciones 4.3.1, 4.3.2 y 4.3.3a, se describen algunos métodos publicados para la estimación de la capacidad del pico en elución isocrática. Es conveniente conocerlos para comprender el significado de los nuevos métodos introducidos en la Sección 4.3.3.

#### 4.3.1. Anchuras de pico invariables: el método intuitivo

La capacidad de pico es el número de picos cromatográficos que pueden caber, tocándose entre sí, en una cierta ventana de tiempo. La manera más simple e intuitiva para estimarla es medir el tamaño de la ventana de tiempo de retención en unidades de anchura de pico, considerando que todos los picos tienen la misma anchura:

$$P_c = 1 + \frac{\Delta t}{\bar{w}} \quad (4.1)$$

donde  $\Delta t$  es la ventana de tiempo medida entre los máximos de los dos picos extremos, y  $\bar{w}$  es la anchura media de los picos, que generalmente se toma como  $4\sigma$  (i.e. la anchura al 13.4% de la altura del pico), aunque a este nivel la separación no es completa. Esta suposición considera de manera implícita que  $R_s = 1$  (siendo  $R_s$  la resolución clásica):

$$R_s = \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{\frac{w_1 + w_2}{2}} \quad (4.2)$$

$t_{R,1}$  y  $t_{R,2}$  son los tiempos de retención de pares de picos vecinos, y  $w_1$  y  $w_2$  sus anchuras, que se miden también por lo general como  $4\sigma$ . Para otros valores de  $R_s$ , la Ecuación (4.1) puede expresarse como:

$$P_c = 1 + \frac{\Delta t}{R_s \bar{w}} \quad (4.3)$$

El término “1” en las Ecuaciones (4.1) y (4.3) se añade para tener en cuenta las semianchuras frontal y de cola del primer y último picos eluidos, respectivamente. El límite inferior de  $\Delta t$  puede corresponder al pico de un compuesto no retenido (i.e. que eluye en el tiempo muerto), o ser un tiempo arbitrario al inicio del cromatograma (con frecuencia, el del pico que eluye en primer lugar), y el límite superior es el tiempo de retención de un pico seleccionado (con frecuencia, el último pico eluido). En elución en gradiente, se toma a menudo  $\Delta t$  como  $t_G - t_D - t_0$  (tiempo del gradiente, i.e. el tiempo al cual se alcanza la composición final; tiempo de retraso, i.e. el tiempo necesario para que el frente del gradiente alcance la entrada de la columna; y el tiempo muerto, respectivamente) [1]. La capacidad de pico en el modo gradiente es mayor que en el modo isocrático, debido al efecto de compresión de los picos.

La Ecuación (4.1) ignora los cambios en la anchura del pico con el tiempo de retención. De hecho, en algunos modos cromatográficos utilizados en modo gradiente, la anchura del pico es bastante uniforme a lo largo del cromatograma (especialmente para pequeños valores de  $\Delta t$ ) [14], por lo que es posible seleccionar cualquier pico para medir la anchura, pero en otros casos ésta puede aumentar fácilmente con la retención. Puesto que la medida de las anchuras de múltiples picos en un cromatograma puede requerir un tiempo considerable, muy a menudo la capacidad de pico se estima promediando la anchura de unos pocos picos.

Dolan *et al.* [14] relacionaron las definiciones de  $P_c$  y  $R_s$  (Ecuación (4.2)), y propusieron una estimación modificada de la capacidad de pico, a la que se denominó “capacidad de pico de la muestra”.

$$P_c^{**} = \frac{\Delta t}{\bar{w}} \quad (4.4)$$

Para capacidades de pico suficientemente grandes:  $P_c \approx P_c^{**}$ .

### 4.3.2. Eficacias de pico invariables

#### a) El método de Giddings

Giddings [3] cuantificó la capacidad de pico basándose en lo siguiente:

$$t_{R,i+1} - t_{R,i} = \frac{w_{i+1} + w_i}{2} = \frac{4\sigma_{i+1} + 4\sigma_i}{2} \quad (4.5)$$

que indica que la distancia entre dos picos adyacentes que se tocan entre sí no es mayor que la media de la anchura de los dos picos. De nuevo se adoptó como anchura de pico el valor  $4\sigma$  para garantizar la resolución ( $R_s = 1.0$ ). A partir de:

$$\sigma = \frac{t_R}{\sqrt{N}} = m_\sigma t_R \quad (4.6)$$

se obtuvo la siguiente ecuación:

$$t_{R,i+1} - t_{R,i} = \alpha \frac{t_{R,i+1} + t_{R,i}}{2} \quad (4.7)$$

donde

$$\alpha = \frac{4}{\sqrt{N}} \quad (4.8)$$

A partir de la Ecuación (4.7), la relación de los tiempos de retención para cualquier par de picos adyacentes se puede expresar como:

$$\frac{t_{R,i+1}}{t_{R,i}} = \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \quad (4.9)$$

Para el primer y el último pico:

$$\frac{t_{R,n}}{t_{R,1}} = \left( \frac{t_{R,2}}{t_{R,1}} \right) \left( \frac{t_{R,3}}{t_{R,2}} \right) \dots \left( \frac{t_{R,n}}{t_{R,n-1}} \right) = \left( \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \right) \left( \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \right) \dots \left( \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \right) = \left( \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \right)^{n-1} \quad (4.10)$$

donde  $P_c = n$ . En forma logarítmica:

$$\ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}} = (P_c - 1) \ln \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \quad (4.11)$$

y finalmente:

$$P_c = 1 + \frac{\ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}}}{\ln \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2}} \quad (4.12)$$

En la mayoría de situaciones prácticas,  $N$  posee un valor elevado ( $>10^3$ ), y por lo tanto,  $\alpha$  es suficientemente pequeña (Ecuación (4.8)). Basándose en esta observación, Giddings expandió el denominador de la Ecuación (4.12) como:

$$\ln \left( \frac{1 + \alpha/2}{1 - \alpha/2} \right) = \alpha + \frac{1}{3} \alpha^3 + \dots \quad (4.13)$$

y despreció todos los términos, excepto el primero:

$$P_c = 1 + \frac{1}{\alpha} \ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}} \quad (4.14)$$

Realizar esta simplificación supone un error ligeramente mayor al 1% para  $N = 500$  (una cifra muy pesimista en cromatografía).

La capacidad de pico se expresó también como función de los factores de retención para el primer ( $k_1$ ) y último ( $k_n$ ) picos:

$$P_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{1 + k_n}{1 + k_1} \quad (4.15)$$

siendo:

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0} \quad (4.16)$$

Las Ecuaciones (4.14) y (4.15) consideran que el ensanchamiento de los picos varía con el tiempo de retención. Nótese que el término de la eficacia está afectado por el diámetro y la longitud de la columna, el tamaño de partícula, el flujo y la pendiente del gradiente (en elución en gradiente). La ecuación de Giddings supone que la columna proporciona la misma eficacia para todos los solutos eluidos [3], lo que implica un incremento en las anchuras de los picos proporcional al tiempo de retención siguiendo el comportamiento ideal (Ecuación (4.6)). Además,  $t_{R,1}$  no es necesariamente el tiempo de retención de un compuesto no retenido.



### **b) El método de Grushka**

Grushka [6] propuso un tratamiento infinitesimal de la definición de capacidad de pico (véanse también las Ecuaciones (4.1) y (4.6)):

$$dn = \frac{dt}{w} = \frac{dt}{4\sigma} = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{dt}{t} \quad (4.17)$$

cuya integral es:

$$\int_1^n dn = n - 1 = P_c - 1 = \frac{\sqrt{N}}{4} \int_{t_{R,1}}^{t_{R,n}} \frac{dt}{t} \quad (4.18)$$

obteniéndose directamente la solución de Giddings (Ecuación (4.14)). Sin embargo, Grushka tomó como límite inferior ( $t_{R,1}$ ), el tiempo muerto, lo que simplifica la Ecuación (4.15):

$$P_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln(1 + k_n) \quad (4.19)$$

La Ecuación (4.19) supone un aumento de la capacidad de pico con el factor de retención. Sin embargo, la velocidad de incremento disminuye con  $k$ .

### **4.3.3. Dependencia de la eficacia con el tiempo de retención**

Tal y como se ha comentado, Giddings y Grushka consideraron que  $N$  es la misma para todos los solutos. Sin embargo, a menudo,  $N$  tiende a aumentar con la retención, y la suposición de un valor de  $N$  invariable para solutos con diferente retención puede dar como resultado una estimación errónea de la capacidad de pico. Nosotros consideraremos de nuevo los tres métodos descritos (el método intuitivo, y los métodos propuestos por Giddings y Grushka), asumiendo cambios de  $N$  con la retención. Empezaremos con algunas ecuaciones publicadas, que están basadas en el método propuesto por Grushka, y a continuación, introduciremos nuevas perspectivas basadas en los métodos de Grushka, de Giddings y el intuitivo.

**a) El método de Grushka**

Se han publicado al menos tres ecuaciones basadas en el método de Grushka que consideran la dependencia de  $N$  con la retención. En una de las modificaciones propuestas, se asumió que  $N$  seguía una dependencia polinomial con el factor de retención [15]:

$$P_c = 1 + \frac{1}{4} \int_{t_0}^{t_{R,n}} \frac{\sqrt{N}}{t} dt = 1 + \frac{1}{4} \int_0^k \frac{\sqrt{(N_\infty + b/k + c/k^2 + \dots)}}{1+k} dk \quad (4.20)$$

Para valores de  $k$  suficientemente grandes,  $N \rightarrow N_\infty$ .

Más tarde, otros autores consideraron una relación lineal entre la anchura de los picos a la mitad de la altura ( $w_{1/2}$ ) y el tiempo de retención [16]:

$$w_{1/2} = a t_R - b \quad (4.21)$$

donde  $a$  y  $b$  son parámetros de ajuste, y  $b$  refleja cualquier contribución extra-columnar. Teniendo en cuenta que:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (4.22)$$

se obtuvo lo siguiente:

$$P_c = 1 + \frac{1}{4} \int_{t_{R,1}}^{t_{R,n}} \frac{\sqrt{N}}{t} dt = 1 + \frac{\sqrt{5.54}}{4} \int_{t_{R,1}}^{t_{R,n}} \frac{1}{a t_R - b} dt = 1 + \frac{\sqrt{5.54}}{4a} \ln \frac{a t_{R,n} - b}{a t_{R,1} - b} \quad (4.23)$$

A medida que  $t_R$  aumenta, el término  $b$  se hace despreciable, y la Ecuación (4.23) se reduce a la Ecuación (4.14), publicada por Giddings y Grushka. Debe tenerse en cuenta que este método puede adaptarse fácilmente a otras relaciones de altura de pico.

Se obtuvo otra ecuación por integración de la Ecuación (4.17), expresada como una función de la desviación estándar, considerando factores de retención en lugar de tiempos de retención [17]:

$$P_c = 1 + \frac{1}{4} \int_0^{k_n} \frac{1}{\sigma_k} dk \quad (4.24)$$

donde:

$$\sigma_k = \frac{\sigma_t}{t_0} = \frac{1+k}{\sqrt{N}} = (1+k) \sqrt{\frac{H}{L}} \quad (4.25)$$

siendo  $L$  la longitud de la columna y  $H$  la altura del plato teórico. Se obtuvieron los siguientes resultados:

$$P_c = 1 + \frac{\sqrt{L}}{4} \int_0^{k_n} \frac{1}{\sqrt{H(k)}} \frac{1}{(1+k)} dk \quad (4.26)$$

En el trabajo publicado, la Ecuación (4.26) se integró a trozos, asumiendo que  $H$  era aproximadamente la misma para dos picos adyacentes [17]. Así, para un cromatograma con  $n$  componentes:

$$P_c = 1 + \frac{\sqrt{L}}{4} \sum_{i=1}^n \int_{k_{i-1}}^{k_i} \frac{1}{\sqrt{H_i}} \frac{1}{(1+k)} dk = 1 + \frac{\sqrt{L}}{4} \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sqrt{H_i}} \ln \frac{1+k_i}{1+k_{i-1}} \quad (4.27)$$

Finalmente, los autores realizaron una simplificación suponiendo picos con una altura de plato promedio:

$$P_c = 1 + \frac{\sqrt{L}}{4} \frac{1}{\sqrt{H}} \ln(1+k_n) \quad (4.28)$$

lo que coincide con la Ecuación (4.19).

Como se ve, la inclusión de los cambios en la eficacia o en la anchura del pico con el tiempo de retención en la integral de Grushka puede realizarse de múltiples maneras (veáanse las Ecuaciones (4.20) o (4.23)). Idealmente, las funciones de dependencia deberían tener un significado físico, pero al mismo tiempo deberían ser simples e integrables. A continuación, se muestra un nuevo método que reúne estas condiciones.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta que el comportamiento global de un sistema cromatográfico (ensanchamiento de los picos) depende del comportamiento de la columna y de la contribución extra-columnar:

$$\sigma_{\text{tot}}^2 = \sigma_{\text{col}}^2 + \sigma_{\text{ext}}^2 \quad (4.29)$$

donde  $\sigma_{\text{tot}}^2$  es la varianza de pico total observada,  $\sigma_{\text{col}}^2$  la varianza de la columna, y  $\sigma_{\text{ext}}^2$  recoge las contribuciones extra-columnares (e.g. asociadas a los tubos de conexión, al inyector, y a la celda del detector) [18,19]. El cambio en la eficacia con la retención

puede interpretarse como una disminución relativa de la importancia de las contribuciones extra-columnares al ensanchamiento de los picos. En ausencia de interacciones particulares entre los solutos y la fase estacionaria, el valor de  $N$  para una columna ( $N_{\text{col}}$ ) puede considerarse independiente del tiempo de retención. A partir de la Ecuación (4.6):

$$\sigma_{\text{tot}}^2 = m_{\sigma}^2 t_R^2 + \sigma_{\text{ext}}^2 = m_{\sigma}^2 \left( t_R^2 + \frac{\sigma_{\text{ext}}^2}{m_{\sigma}^2} \right) \quad (4.30)$$

y a partir de la Ecuación (4.17):

$$P_c = 1 + \frac{1}{4 m_{\sigma}} \int_{t_{R,1}}^{t_{R,n}} \frac{dt_R}{\sqrt{t_R^2 + \frac{\sigma_{\text{ext}}^2}{m_{\sigma}^2}}} = 1 + \frac{1}{4 m_{\sigma}} \ln \left( \frac{t_{R,n}^2 + \sqrt{t_{R,n}^2 + \frac{\sigma_{\text{ext}}^2}{m_{\sigma}^2}}}{t_{R,1}^2 + \sqrt{t_{R,1}^2 + \frac{\sigma_{\text{ext}}^2}{m_{\sigma}^2}}} \right) \quad (4.31)$$

Esta ecuación requiere del conocimiento de  $m_{\sigma}$  y  $\sigma_{\text{ext}}^2$ , y por lo tanto, de la varianza de pico total (Ecuación (4.30)). Sin embargo, el cálculo de estos parámetros no es directo para los picos asimétricos reales [20]. A continuación, se sugieren tres métodos diferentes para realizarlo. El primer método considera que la varianza equivalente de pico para picos asimétricos puede calcularse a partir del momento de segundo orden, de acuerdo con la aproximación propuesta por Foley y Dorsey [20]:

$$\overline{M}_2 = \frac{w_{10\%}^2}{1.764(B/A)^2 - 11.15(B/A) + 28} \quad (4.32)$$

donde las anchuras ( $w_{10\%}$ ) se miden al 10% de la altura del pico. Se ha indicado que la Ecuación (4.32) proporciona errores  $<1.5\%$  para asimetrías en el intervalo 1.00–2.76 (relación  $B/A$ , siendo  $A$  y  $B$  las semianchuras frontal y de cola, respectivamente, medidas al 10% de la altura del pico). Para los otros dos métodos:

$$\sigma_{\text{tot}}^2 = \frac{1}{4.6} \left( \frac{w}{2} \right)^2 = \frac{(A+B)^2}{4 \times 4.6} \quad (4.33)$$

$$\sigma_{\text{tot}}^2 = \frac{A^2 + B^2}{2 \times 4.6} \quad (4.34)$$

Donde el factor 4.6 se ha incluido para considerar la medida de  $A$  y  $B$  al 10% de la altura del pico.

### **b) El método de Giddings modificado para picos no gaussianos**

En los métodos descritos anteriormente, se suponen perfiles de elución ideales. Sin embargo, diversos fenómenos pueden producir picos cromatográficos asimétricos con anchuras mayores que las esperadas. Reconsideraremos aquí el método propuesto por Giddings, asumiendo cambios en la anchura y la asimetría de los picos cromatográficos (que llamaremos método de Giddings modificado). Antes de proceder, se debería tener en cuenta lo siguiente:

- (i) Las relaciones lineales entre la anchura de pico (i.e. desviación estándar) y el tiempo de retención que supongan una ordenada en el origen nula en la Ecuación (4.6) sólo son posibles para picos cromatográficos ideales.
- (ii) Por conveniencia, en ventanas de tiempo moderadas, la Ecuación (4.30) puede aproximarse a una dependencia lineal entre la anchura del pico (o desviación estándar) y el tiempo de retención (Ecuación (4.21)). Esto también permite relacionar individualmente las semianchuras  $A$  y  $B$  con el tiempo de retención:

$$A = m_A (t_R - t_0) + A_0 = m_A t + A_0 \quad (4.35)$$

$$B = m_B (t_R - t_0) + B_0 = m_B t + B_0 \quad (4.36)$$

donde  $A_0$  y  $B_0$  (i.e. las semianchuras de un pico que eluye en el tiempo muerto,  $t_0$ ) corresponden a las contribuciones extra-columnares, que como se ha comentado son más significativas para los picos más estrechos que eluyen a tiempos de retención más cortos. En ventanas grandes, no puede despreciarse la curvatura, y se necesitan relaciones parabólicas [21].

- (iii) El comportamiento descrito en la Ecuación (4.30) no puede incorporarse en el método de Giddings.
- (iv) Por último, al dividir la anchura del pico en las dos semianchuras, la asimetría permanece explícita en la expresión modificada de Giddings.

Giddings asumió que los picos cromatográficos eran gaussianas perfectas, con anchuras  $w = 4\sigma$  ( $R_s = 1$ , Ecuación (4.5)). Con el fin de considerar una situación más general, la Ecuación (4.7) puede reescribirse en unidades estandarizadas ( $z$ ):

$$t_{R,i+1} - t_{R,i} = 2z m_\sigma \frac{t_{R,i+1} + t_{R,i}}{2} \quad (4.37)$$

Giddings adoptó el valor  $z = 2$  ( $\alpha = 2zm_\sigma = 4m_\sigma$ ). La Ecuación (4.37) permite adoptar cualquier valor de  $R_S$  (i.e.  $R_S = 1$  o  $\neq 1$ ). De acuerdo con ello, las Ecuaciones (4.12) y (4.14) pueden reformularse como:

$$P_c = 1 + \frac{\ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}}}{\ln \frac{1 + zm_\sigma}{1 - zm_\sigma}} \quad (4.38)$$

y

$$P_c = 1 + \frac{1}{2zm_\sigma} \ln \frac{t_{R,n}}{t_{R,1}} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{2z} \ln \frac{t_n + t_0}{t_1 + t_0} \quad (4.39)$$

siendo  $t_n$  y  $t_1$  los tiempos de retención corregidos. Consideremos ahora que en lugar de un pico ideal (i.e. con semianchuras iguales), cada pico posee valores particulares de las semianchuras, que varían con el tiempo de retención de acuerdo a las Ecuaciones (4.35) y (4.36). De manera similar a la Ecuación (4.5), podemos escribir:

$$t_{i+1} - t_i = z(A_{i+1} + B_i) = z(m_A t_{i+1} + A_0 + m_B t_i + B_0) \quad (4.40)$$

que implícitamente asume que  $A$  y  $B$  se miden desde el centro del pico a sus puntos de inflexión. Se obtiene lo siguiente:

$$t_{i+1} = \frac{1 + zm_B}{1 - zm_A} t_i + z \frac{A_0 + B_0}{1 - zm_A} = \delta t_i + \Delta_0 \quad (4.41)$$

De este modo:

$$t_2 = \delta t_1 + \Delta_0 \quad (4.42)$$

$$t_3 = \delta t_2 + \Delta_0 = \delta^2 t_1 + \delta \Delta_0 + \Delta_0 \quad (4.43)$$

$$t_4 = \delta t_3 + \Delta_0 = \delta^3 t_1 + \delta^2 \Delta_0 + \delta \Delta_0 + \Delta_0 \quad (4.44)$$

y para cualquier pico:

$$t_i = \delta^{i-1} t_1 + \sum_{j=0}^{i-2} \delta^j \Delta_0 = \delta^{i-1} t_1 + \frac{\delta^{i-1} - 1}{\delta - 1} \Delta_0 \quad (4.45)$$

Por conveniencia, la Ecuación (4.45) se expresará como:

$$t_i = \delta^{i-1} t_1 + (\delta^{i-1} - 1) T_0 \quad (4.46)$$

A partir de las Ecuaciones (4.41) y (4.45) se obtiene:

$$T_0 = \frac{\Delta_0}{\delta - 1} = \frac{z \frac{A_0 + B_0}{1 - z m_A}}{\frac{1 + z m_B}{1 - z m_A} - 1} = \frac{A_0 + B_0}{m_A + m_B} \quad (4.47)$$

Por lo tanto,  $T_0$  es el tiempo de retención para un pico ideal, con una anchura  $(A_0 + B_0)$ .

Finalmente:

$$P_c = 1 + \frac{\ln \frac{t_n + T_0}{t_1 + T_0}}{\ln \delta} = 1 + \frac{\ln \frac{t_n + T_0}{t_1 + T_0}}{\ln \frac{1 + z m_B}{1 - z m_A}} \quad (4.48)$$

Giddings llegó a una ecuación similar (Ecuación (4.12), véase también la Ecuación (4.38)), pero decidió sustituir el término logarítmico en el denominador para obtener la Ecuación (4.14), que es más simple. Sin embargo, la Ecuación (4.12) es ya simple, por lo que, en nuestra opinión esta operación puede omitirse. Sin embargo, con propósitos comparativos, expandimos el denominador en la Ecuación (4.48), tal y como se muestra a continuación:

$$\ln \frac{1 + z m_B}{1 - z m_A} = z(m_A + m_B) + z^2 \frac{m_A^2 - m_B^2}{2} + z^3 \frac{(m_A + m_B)(m_A^2 + m_B^2 - m_A m_B)}{3} + \dots \quad (4.49)$$

y descartamos todos los términos, excepto el primero, obteniéndose:

$$P_c = 1 + \frac{1}{z(m_A + m_B)} \ln \frac{t_n + T_0}{t_1 + T_0} \quad (4.50)$$

que puede compararse con las Ecuaciones (4.14) o (4.39). Para un pico ideal simétrico,  $m_A = m_B = m_\sigma$ , y  $A_0 = B_0 = m_\sigma t_0$ . A partir de la Ecuación (4.47):

$$T_0 = \frac{2 m_\sigma t_0}{2 m_\sigma} = t_0 \quad (4.51)$$

y la Ecuación (4.50) da lugar a la Ecuación (4.39).

**c) El método intuitivo incluyendo cambios en la eficacia**

El método intuitivo simple (Ecuación (4.3)) también permite incorporar cambios en la eficacia con el tiempo de retención. Con este fin, en lugar de utilizar un promedio de la anchura de los picos obtenida a partir de algunos picos representativos, se utilizaron las semianchuras promedio:

$$P_c = 1 + \frac{t_n - t_1}{z(\bar{A} + \bar{B})} \quad (4.52)$$

que se calcularon mediante integración:

$$\bar{A} = \frac{\int_{t_1}^{t_n} A(t) dt}{\int_{t_1}^{t_n} dt} = \frac{\int_{t_1}^{t_n} A(t) dt}{t_n - t_1} \quad (4.53)$$

Asumiendo de nuevo una relación lineal entre la semianchura frontal y el tiempo (Ecuación (4.35)), la integración de la Ecuación (4.53) conduce a:

$$\bar{A} = \frac{\frac{m_A}{2}(t_n^2 - t_1^2) + A_0(t_n - t_1)}{t_n - t_1} = \frac{m_A}{2}(t_n + t_1) + A_0 \quad (4.54)$$

y de manera similar, para la semianchura de cola a partir de la Ecuación (4.36):

$$\bar{B} = \frac{m_B}{2}(t_n + t_1) + B_0 \quad (4.55)$$

Sustituyendo las Ecuaciones (4.54) y (4.55) en la Ecuación (4.52):

$$P_c = 1 + \frac{t_n - t_1}{z \left( \frac{m_A + m_B}{2}(t_n + t_1) + (A_0 + B_0) \right)} \quad (4.56)$$

En contraste con Giddings, este método admite relaciones entre la anchura y el tiempo de mayor orden. Así, para una dependencia parabólica entre  $A$  y  $t_R$ , la Ecuación (4.53) dará como resultado:

$$\bar{A} = \frac{\frac{a_A}{3}(t_n^3 - t_1^3) + \frac{m_A}{2}(t_n^2 - t_1^2) + A_0(t_n - t_1)}{t_n - t_1} \quad (4.57)$$



#### 4.4. Parte experimental

Para evaluar la exactitud en la estimación de la capacidad de pico, se utilizaron datos cromatográficos (i.e. tiempos de retención, alturas, semianchuras frontal y de cola) adquiridos en nuestro laboratorio a lo largo de varios años. La base de datos utilizada incluye información de más de mil picos, correspondientes a los siguientes conjuntos de compuestos:

- (i) Sulfonamidas: sulfacetamida, sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfamonometoxina, sulfanilamida, sulfaquinoxalina y sulfisoxazol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), y sulfametazina (Aldrich, Milwaukee, WI, EE.UU.).
- (ii) Esteroides: acetato de clotestol, deshidrotestosterona, enantato de metenolona y metiltestosterona (Sigma), didrogesterona (Kalifarma, Barcelona), acetato de medroxiprogesterona (Cusí, Barcelona), nandrolona (Fher, Barcelona), decanoato de nandrolona (Organón, Barcelona), progesterona (Seid, Barcelona), testosterona, enantato de testosterona y propionato de testosterona (Schering, Madrid).
- (iii)  $\beta$ -Bloqueantes: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid), alprenolol, pindolol, sotalol (Sigma), atenolol (Zeneca Farma, Madrid), bisoprolol, propranolol, practolol (ICI-Farma, Madrid), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona), celiprolol (Rhône-Poulenc Rorer, Alcorcón, Madrid), esmolol (Polfa, Starogard, Polonia), labetalol (Glaxo, Tres Cantos, Madrid), metoprolol, oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona), nadolol (Squibb, Esplugues de Llobregat, Barcelona) y timolol (Merck, Sharp & Dohme, Madrid).
- (iv) Antidepresivos tricíclicos: amitriptilina, clomipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina y trimipramina (Sigma).
- (v) Diuréticos: altiazida, benzotiazida, bumetanida, clorotiazida, furosemida, hidroclorotiazida, probenecid, triantereno, triclorometiazida (Sigma), amilorida (ICI-Farma), bendroflumetiazida (Davur, Madrid), clortalidona (Ciba-Geigy), ácido etacrínico (Merck, Sharp & Dohme), piretanida (Cusí), espironolactona (Searle, Madrid) y xipamida (Lacer, Barcelona).

En el modo hidro-orgánico, las fases móviles contenían acetonitrilo, metanol (Scharlab, Barcelona) y trietilamina (TEA, Fluka, Buchs, Suiza), y en el modo micelar, dodecilsulfato sódico (99% pureza, Merck, Darmstadt, Alemania), y acetonitrilo, propanol, y pentanol (Scharlab). El pH se tamponó en el intervalo 3–7 con ácido cítrico monohidrato o hidrógenofosfato disódico, y NaOH o HCl (Panreac, Barcelona).

Los resultados cromatográficos se obtuvieron utilizando varios sistemas de HPLC de Agilent (Series 1050 y 1100, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipados con bombas isocráticas, inyectoros automáticos, detectores UV-visible y controladores de temperatura. Las columnas cromatográficas (125×4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula) fueron las siguientes: Spherisorb ODS-2 (Scharlab), Hypersil C18 (Agilent, Walbronn, Alemania), Kromasil C18 (Análisis Vínicos, Ciudad Real), XTerra MS C18 y Zorbax SB C18 (Agilent).

## 4.5. Resultados y discusión

La Ecuación (4.14) o la más general Ecuación (4.39) son adecuadas para medir la capacidad de pico para picos simétricos ( $m_A = m_B$ ), siempre que la eficacia permanezca constante a lo largo del cromatograma. Como éste no es el caso general, la capacidad de pico tiende a sobreestimarse, como se demostrará a continuación. Aquí proponemos tres nuevas ecuaciones (Ecuaciones (4.31), (4.48) y (4.56)), que permiten considerar los cambios en la eficacia en la estimación de la capacidad de pico. La Ecuación (4.48) permite también valores diferentes para las semianchuras frontal y de cola ( $m_A \neq m_B$ ).

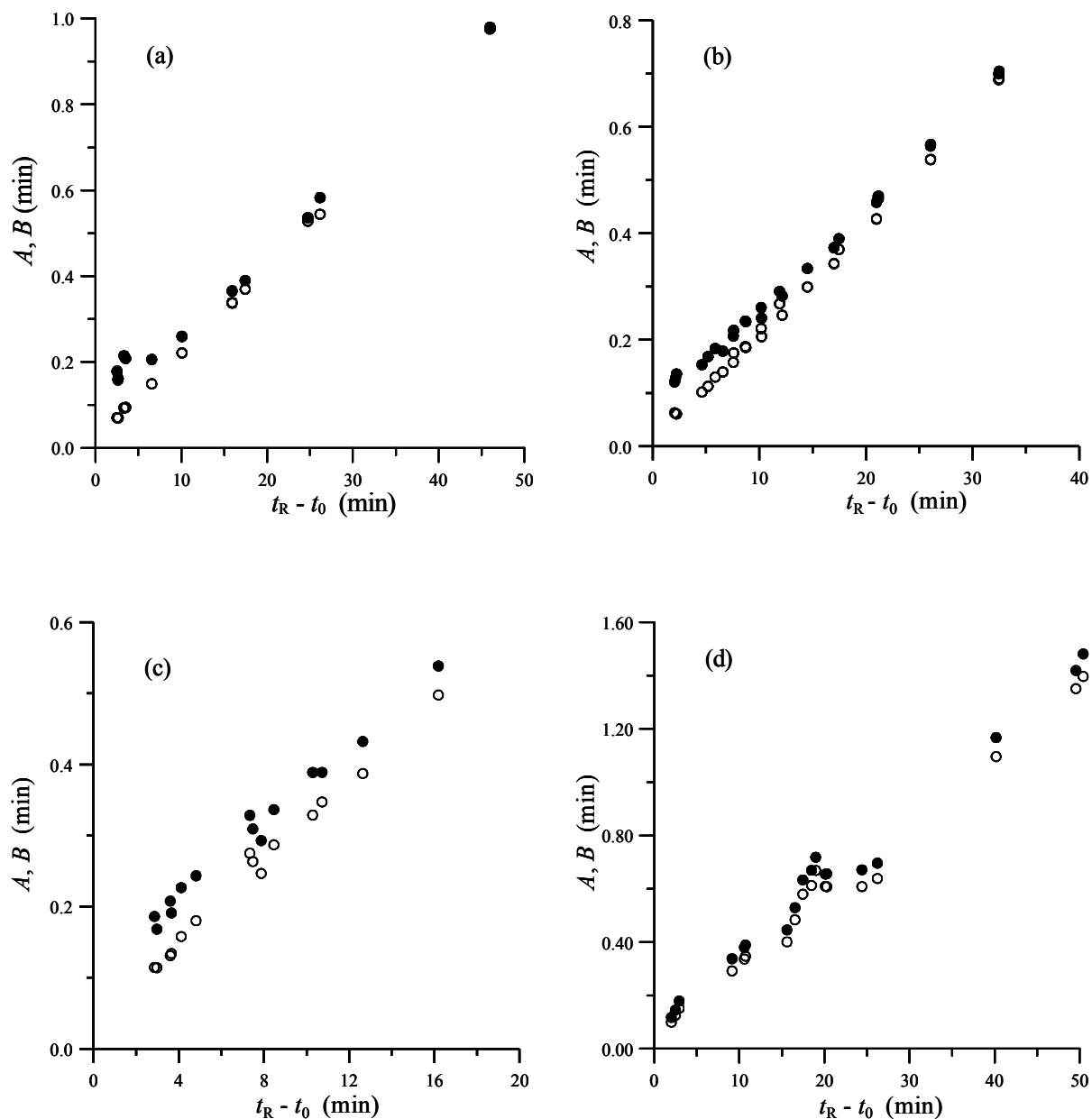
### 4.5.1. Dependencia de las semianchuras de pico con el tiempo de retención

Para picos cromatográficos ideales, la desviación estándar se relaciona linealmente con el tiempo de retención con ordenada en el origen nula (Ecuación (4.6)). Para picos asimétricos, las semianchuras dependen del tiempo de retención de forma aproximadamente lineal, con valores residuales a  $t_0$  ( $A_0$  y  $B_0$ ) (Ecuaciones (4.35) y (4.36)). Tal y como se mostrará a continuación, las relaciones lineales se cumplen satisfactoriamente, al menos para las ventanas de tiempo usuales. Las semianchuras se midieron al 10% de la altura del pico. De acuerdo a nuestra experiencia, la medida a esta

relación de altura es cómoda y, además, las asimetrías de los picos se establecen mejor que a alturas superiores.

Cuando se ajustan las Ecuaciones (4.35) y (4.36) con un conjunto de solutos que exhiben aproximadamente la misma eficacia y asimetría intrínsecas, los parámetros  $m_A$  y  $m_B$  son característicos para el sistema columna/disolvente. Por consiguiente, estas ecuaciones pueden ajustarse utilizando los datos de retención de varios compuestos con polaridades diferentes eluidos con la misma fase móvil, o con un compuesto seleccionado eluido con fases móviles de diversa composición (i.e. contenido de disolvente orgánico). La Figura 4.1a muestra la correlación de  $A$  y  $B$  con el tiempo de retención para un conjunto de 10 compuestos (diuréticos y  $\beta$ -bloqueantes: oxprenolol, clortalidona, bendroflumetiazida, propranolol, alprenolol, furosemida, benzotiazida, xipamida, bumetanida y probenecid), eluidos con una fase móvil de acetonitrilo al 35% (v/v). La Figura 4.1b muestra el comportamiento de la xipamida, eluida con fases móviles de acetonitrilo en el intervalo 25–50%. En ambos casos, se obtuvo una dependencia prácticamente lineal, especialmente para la semianchura frontal ( $A$ ). La mejor linealidad para  $A$  podría ser debida a la mayor exactitud en la detección del punto al 10% de la altura del pico en la parte delantera del pico. Como puede observarse, los picos procesados poseen colas ( $B > A$ ), aunque la simetría del pico se mejora al incrementarse el tiempo de retención.

El disolvente orgánico se adsorbe sobre la fase estacionaria, afectando al equilibrio de reparto del soluto. De acuerdo a ello, se observaron algunos cambios en los parámetros de los picos al variar la composición de la fase móvil. Así, para el conjunto de diuréticos y  $\beta$ -bloqueantes eluidos con acetonitrilo al 30% y 45%:  $m_A = 0.0206$  y  $0.0182$ ,  $m_B = 0.0183$  y  $0.0154$ ,  $A_0 = 0.0464$  y  $0.0478$ , y  $B_0 = 0.104$  y  $0.102$ , respectivamente, con  $R^2 > 0.996$ . Este resultado sugiere que la medida de los parámetros del perfil de pico debe realizarse preferiblemente con un conjunto de compuestos eluidos con una única fase móvil.



**Figura 4.1.** Dependencia de la semianchura frontal ( $A$ ,  $\circ$ ) y de cola ( $B$ ,  $\bullet$ ) con el tiempo de retención para: (a) un conjunto de 10 compuestos (diuréticos y  $\beta$ -bloqueantes) eluidos con acetonitrilo al 35% (v,v), (b) xipamida eluida con acetonitrilo en el intervalo 25–50%, (c) 13 diuréticos eluidos con SDS 0.15 M/20% de acetonitrilo, y (d) xipamida eluida con SDS/acetonitrilo en los intervalos 0.05–0.15 M y 10–20%, respectivamente. En todos los casos, el pH de la fase móvil fue 3.

El comportamiento es más complejo en mezclas hidro-orgánicas que contienen tensioactivo formando micelas (i.e. RPLC micelar). La Figura 4.1c muestra la dependencia entre la semianchura frontal y de cola con el tiempo de retención, para un conjunto de 13 diuréticos, algunos de ellos incluidos en el conjunto anterior: triclorometiazida, clortalidona, altiazida, furosemida, benzotiazida, bendroflumetiazida, piretanida, amilorida, bumetanida, probenecid, xipamida, ácido etacrínico y triantereno). La fase móvil contenía dodecilsulfato sódico 0.15 M y 20% (v/v) de acetonitrilo. La linealidad de nuevo resultó satisfactoria. Sin embargo, la situación cambió cuando se eluyó un compuesto seleccionado (o un conjunto de compuestos) con fases móviles micelares a diversas concentraciones de SDS y acetonitrilo. La Figura 4.1d muestra la correlación entre las semianchuras y el tiempo de retención para la xipamida, eluida con diferentes fases móviles en los intervalos de SDS y acetonitrilo 0.05–0.15 M y 10–20% (v/v), respectivamente. La correlación es significativamente más pobre respecto a la obtenida con una única composición de fase móvil.

En RPLC micelar, las relaciones entre los parámetros del perfil de pico y el tiempo de retención (Ecuaciones (4.35) y (4.36)) dependen de la concentración de ambos, tensioactivo y disolvente orgánico [22]. En este modo cromatográfico, el tensioactivo cubre la fase estacionaria. Los grupos silanol y alquilsilano presentes en las columnas de RPLC convencionales se hallan por lo tanto protegidos, dando lugar a nuevas interacciones entre los solutos y los grupos polares y no polares del tensioactivo. Dependiendo de la carga del soluto y del tensioactivo (i.e. neutra, catiónica o aniónica), estas interacciones pueden ser solamente hidrofóbicas, o también de tipo electroestático (repulsión o atracción). La adición de disolvente orgánico reduce el grosor de la capa de tensioactivo sobre la fase estacionaria, modificando la capacidad de retención y la cinética de absorción/desorción [23].

Se ha comprobado extensamente que se produce un deterioro en la eficacia y simetría de los picos al aumentar la concentración de tensioactivo en la fase móvil, así como una mejora de estos parámetros al adicionar disolvente orgánico, especialmente para acetonitrilo [24,25]. Así, por ejemplo, para el conjunto de diuréticos eluidos con SDS 0.15 M (sin disolvente orgánico) y SDS 0.15 M/20% de acetonitrilo:  $m_A = 0.0417$  y  $0.0268$ ,  $m_B = 0.0467$  y  $0.0248$ ,  $A_0 = 0.0686$  y  $0.0641$ , y  $B_0 = 0.110$  y  $0.128$ , respectivamente. Por lo tanto, la dispersión de los puntos en el gráfico de la Figura 4.1d

debe ser una consecuencia del cambio en la proporción tensioactivo/disolvente orgánico, que modifica el grosor de la capa de tensioactivo sobre la fase estacionaria. De hecho, es posible encontrar dos fases móviles que den lugar a la misma retención, pero que produzcan distinta cobertura de tensioactivo, y en consecuencia, una eficacia distinta.

#### **4.5.2. Simulación de cromatogramas con picos asimétricos**

Las ecuaciones de la Sección 4.3 ofrecen estimaciones del número de picos, que tocándose entre sí, caben en una ventana de tiempo determinada. Nos interesaba conocer la exactitud de estas estimaciones; sin embargo, no es fácil encontrar cromatogramas reales que ilustren la definición de la capacidad de pico. Pensamos, entonces, en una alternativa para comprobar el número de picos que realmente caben en una ventana de tiempo: la simulación de cromatogramas con picos resueltos. Con el fin de incrementar el realismo, construimos cromatogramas sintéticos mediante la adición de picos reales que fueron obtenidos con una columna Spherisorb ODS-2, cuyos descriptores (i.e. tiempo de retención, altura de pico y semianchuras) se hallaban en la base de datos mencionada en la Sección 4.4. Los picos se obtuvieron con fases móviles de naturaleza distinta (hidro-orgánica o micelar), y en su mayoría se trataba de picos asimétricos con  $B/A > 1.2$ , excediendo en algunos casos el valor  $B/A > 2.5$ .

En contraste con estimaciones previas de la capacidad de pico donde  $R_s = 1.0$  (i.e.  $w = 4\sigma$ ), decidimos incrementar la separación entre picos consecutivos para garantizar una resolución cercana a la línea base, adoptando  $R_s = 1.5$  (i.e.  $w = 6\sigma$ ). La razón de adoptar este valor es que los picos cromatográficos no gaussianos sufren un decrecimiento pseudo-exponencial cerca de la línea base, que aumenta la probabilidad de solapamiento entre picos adyacentes. Para los picos ideales y los no ideales considerados en este capítulo, el solapamiento ascendió al 4.6% y 5.5–7% para  $R_s = 1.0$ , y a 0.3% y 0.6–2.5% para  $R_s = 1.5$ , respectivamente. Así, se utilizó  $z = 3$  en lugar de  $z = 2$  en las Ecuaciones (4.31) y (4.39) (i.e.  $6m_\sigma$  en lugar de  $4m_\sigma$ ).

Se reprodujeron los perfiles cromatográficos en base a los descriptores del perfil de los picos tomados de la base de datos, haciendo uso de una función gaussiana modificada con una varianza parabólica (PVMG), que ha demostrado ofrecer buena exactitud [21]. Este modelo de pico posee la ventaja de contener tan sólo cinco parámetros, que pueden relacionarse fácilmente con los cuatro descriptores de pico, y fue propuesto como una mejora del modelo gaussiano modificado polinomialmente (PMG) [26].

Los cromatogramas se construyeron seleccionando, como primer pico, un pico de la base de datos cercano al tiempo muerto. El siguiente pico se incorporó de acuerdo a la condición:

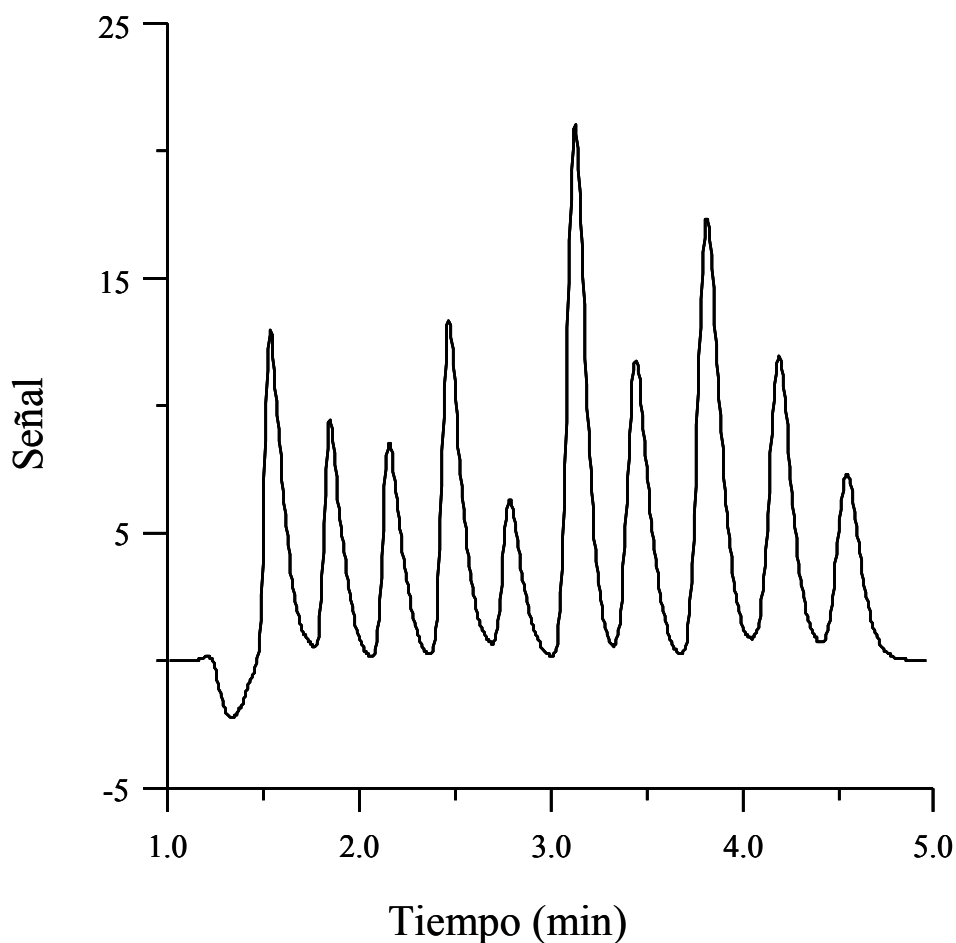
$$t_{i+1} = t_i + 1.4 (B_{i,10\%} + A_{i,10\%}) \quad (4.58)$$

Este pico se desplazó, a continuación, ligeramente (menos de un 10%) con el fin de alcanzar la condición:

$$t_{i+1} = t_i + 1.4 B_{i,10\%} + 1.4 A_{i+1,10\%} \quad (4.59)$$

lo que implica que  $R_s = 1.5$ , puesto que como ya se ha comentado,  $A$  y  $B$  en la base de datos se midieron al 10% de la altura del pico:  $A_{10\%}$  y  $B_{10\%}$  (i.e. para  $w = 4.3\sigma$ ), en lugar del 13.4% (i.e. para  $w = 4\sigma$ ). Por lo tanto, el valor de  $z$  adoptado en las Ecuaciones (4.48) y (4.56) fue  $z = 2.8$ .

Se construyeron tres cromatogramas de acuerdo a estas consideraciones, uno para fases móviles hidro-orgánicas que contenían acetonitrilo, y dos para fases móviles micelares que contenían SDS/acetonitrilo o tan sólo SDS. Como ejemplo, la Figura 4.2 muestra un cromatograma construido para mezclas acetonitrilo-agua, donde se incluyen los diez primeros picos.



**Figura 4.2.** Sección de un cromatograma sintético construido con picos reales, eluidos con mezclas acetonitrilo-agua utilizando una columna Spherisorb ODS-2.

#### **4.5.3. Estimación de la capacidad de pico para los cromatogramas sintéticos**

Se realizó un estudio comparativo de la estimación de la capacidad de pico de acuerdo a las Ecuaciones (4.23), (4.31), (4.39), (4.48) y (4.56), en base a los cromatogramas descritos en la Sección 4.5.2, considerando diversas ventanas de tiempo. Los parámetros  $m_\sigma$  y  $\sigma_{\text{ext}}^2$  (necesarios para realizar los cálculos con la Ecuación (4.31)) se obtuvieron mediante el ajuste de la varianza del pico (calculada a partir de las Ecuaciones (4.32) a (4.34)) frente a  $t_R^2$  según la Ecuación (4.30), y los parámetros  $m_A$ ,  $m_B$ ,  $A_0$  y  $B_0$  (necesarios para las Ecuaciones (4.48) y (4.56)) se obtuvieron mediante el ajuste de las dos semianchuras frente a  $(t_R - t_0)$ , según las Ecuaciones (4.35) y (4.36). También se



ajustó la anchura al 60% de la altura del pico (i.e.  $2\sigma$ ) frente a  $t_R$  (Ecuación (4.6)) para estimar la eficacia asumiendo picos ideales (necesaria para la Ecuación (4.39)). Se evaluó la exactitud en las estimaciones mediante la comparación con el número de picos en los cromatogramas sintéticos obtenidos para cada ventana de tiempo. Los resultados se muestran en las Tablas 4.1 y 4.2 para fases hidro-orgánicas y micelares, respectivamente. También se proporcionan los valores promedio para la asimetría y la eficacia de los picos en las ventanas de tiempo consideradas.

Para el modo hidro-orgánico, la ventana de tiempo total para los cromatogramas sintéticos, que incluyó 36 picos, ocupó el intervalo 1.53–25.87 min. La Figura 4.3a muestra las correlaciones de  $A$  y  $B$  frente a  $(t_R - t_0)$  para las ventanas de tiempo 3.81–25.87 min (Figura 4.3a) y 1.53–10.23 min (Figura 4.3b). Como puede observarse, las correlaciones fueron más pobres para la ventana de tiempo más estrecha, especialmente para  $B$ . Para las fases móviles micelares de SDS/acetonitrilo, la ventana de tiempo total incluyó 21 picos y abarcó el intervalo 1.83–19.43 min. Finalmente, para las fases móviles con SDS, la ventana de tiempo total incluyó 15 picos y abarcó el intervalo 1.40–12.17 min. Las correlaciones correspondientes se muestran en las Figuras 4.3c y 4.3d, respectivamente. Excepto para la semianchura de cola a tiempos de retención cortos, los gráficos muestran una buena linealidad para  $A$  y  $B$  frente al tiempo de retención, lo que le confiere validez a la estimación de la capacidad de pico, basada en la Ecuación (4.48).

**Tabla 4.1.** Exactitud en la estimación de la capacidad de pico en el modo hidro-orgánico.<sup>a</sup>

Ventana de tiempo (min)	Experimental <sup>b</sup>	B/A <sup>c</sup>	N <sup>c</sup>	Ec. (4.39) GI	Ec. (4.48) mGI	Ec. (4.23) mGR	Ec. (4.31) <sup>d</sup> mGR	Ec. (4.31) <sup>e</sup> mGR	Ec. (4.31) <sup>f</sup> mGR	Ec. (4.56) ml
1.54–25.87	36	1.48	6330	47.8	37.6	40.3	33.7	36.1	35.5	29.0
2.15–22.91	32	1.41	6470	40.2	32.9	35.0	30.0	32.1	31.6	26.8
2.79–20.29	28	1.36	6605	33.8	28.4	30.1	26.3	28.1	27.7	24.3
3.44–18.02	24	1.32	6685	28.4	24.0	25.7	22.8	24.2	23.9	21.6
1.53–10.23	21	1.76	4235	28.1	21.0	23.2	18.8	21.2	20.5	19.8
1.84–8.92	18	1.75	4090	23.5	17.8	19.7	16.0	18.1	17.4	17.1
2.47–7.75	14	1.68	4495	17.3	13.6	15.0	12.4	14.0	13.5	13.4
3.12–6.75	10	1.61	4180	12.0	9.7	10.7	8.9	10.0	9.7	9.7

<sup>a</sup> La anchura de pico se midió al 60% de la altura para la Ecuación (4.39), 50% para la Ecuación (4.23), y 10% para las otras ecuaciones. Abreviaturas: método original de Giddings (GI), método modificado de Giddings (mGI), método modificado de Grushka (mGR), y método intuitivo modificado (ml).

<sup>b</sup> Número de picos que caben en los cromatogramas combinados, contruidos de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 4.2.

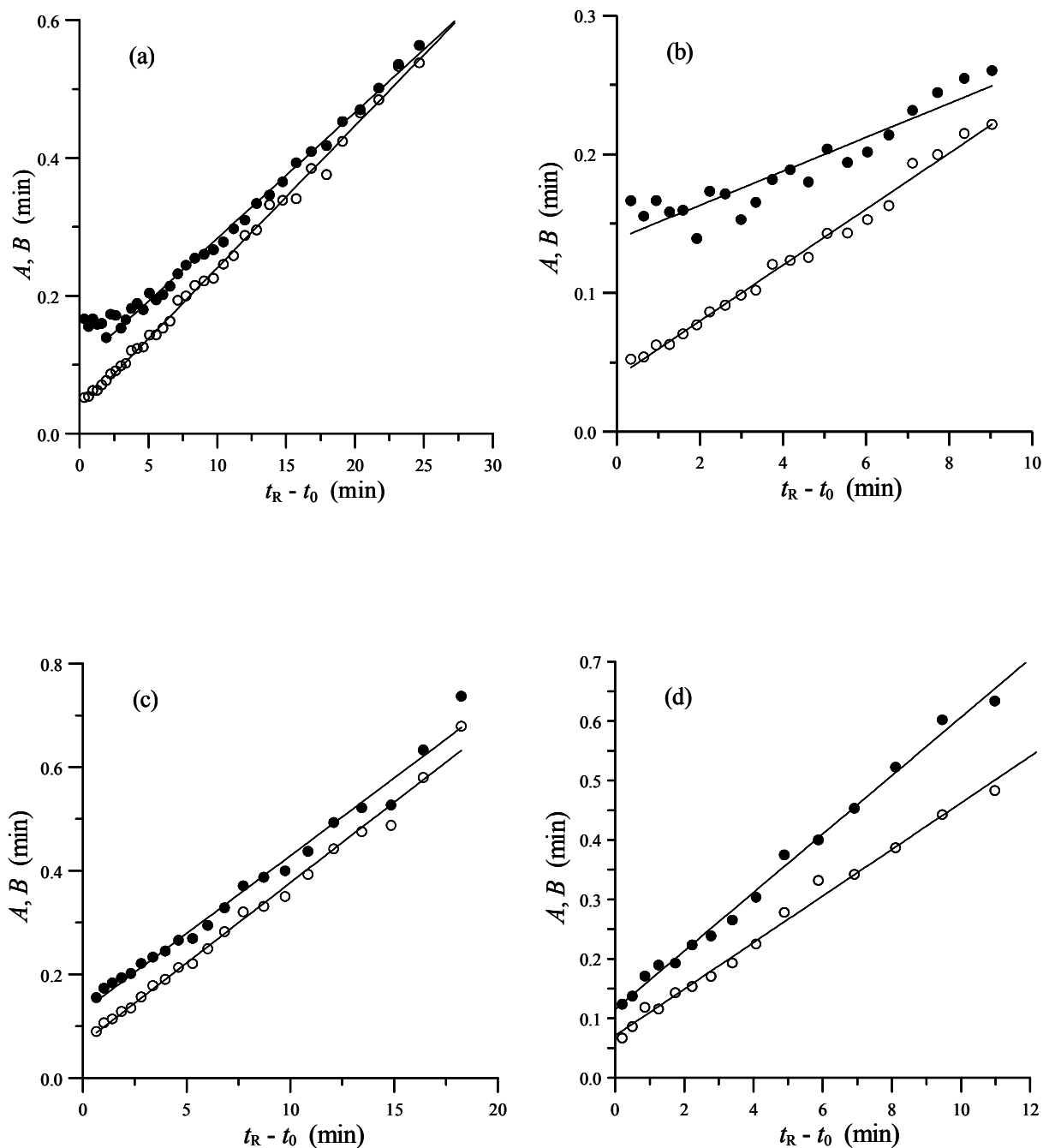
<sup>c</sup> Valores medios en la ventana de tiempo seleccionada.

<sup>d,e,f</sup> Varianza de pico obtenida de acuerdo a las Ecuaciones (4.32), (4.33) y (4.34), respectivamente.

**Tabla 4.2.** Exactitud en la estimación de la capacidad de pico en el modo micelar.<sup>a</sup>

Ventana de tiempo (min)	Valor experimental <sup>b</sup>	<i>B/A</i>	<i>N</i>	Ec. (4.39) GI	Ec. (4.48) mGI	Ec. (4.23) mGR	Ec. (4.31) <sup>c</sup> mGR	Ec. (4.31) <sup>d</sup> mGR	Ec. (4.31) <sup>e</sup> mGR	Ec. (4.56) ml
Fase móvil micelar híbrida conteniendo SDS y acetonitrilo										
1.83–19.43	21	1.28	2660	25.5	21.1	22.2	20.3	21.3	21.1	17.3
2.61–16.05	17	1.25	2770	19.6	16.9	17.8	16.6	17.3	17.2	14.9
3.51–13.28	13	1.23	2790	14.7	12.9	13.5	12.8	13.3	13.2	12.0
4.57–10.94	9	1.21	2845	10.0	8.9	9.3	8.9	9.2	9.2	8.6
Fase móvil micelar pura conteniendo SDS										
1.40–12.17	15	1.42	1360	17.0	15.1	15.9	13.8	14.7	14.5	12.3
1.70–10.66	13	1.40	1365	14.6	13.1	13.8	12.1	12.9	12.7	11.2
2.46–9.30	10	1.38	1445	10.8	10.0	10.4	9.4	10.0	9.9	9.2
3.42–7.08	6	1.36	1490	6.4	6.0	6.2	5.7	6.0	5.9	5.8

<sup>a-f</sup> Ver Tabla 4.1.

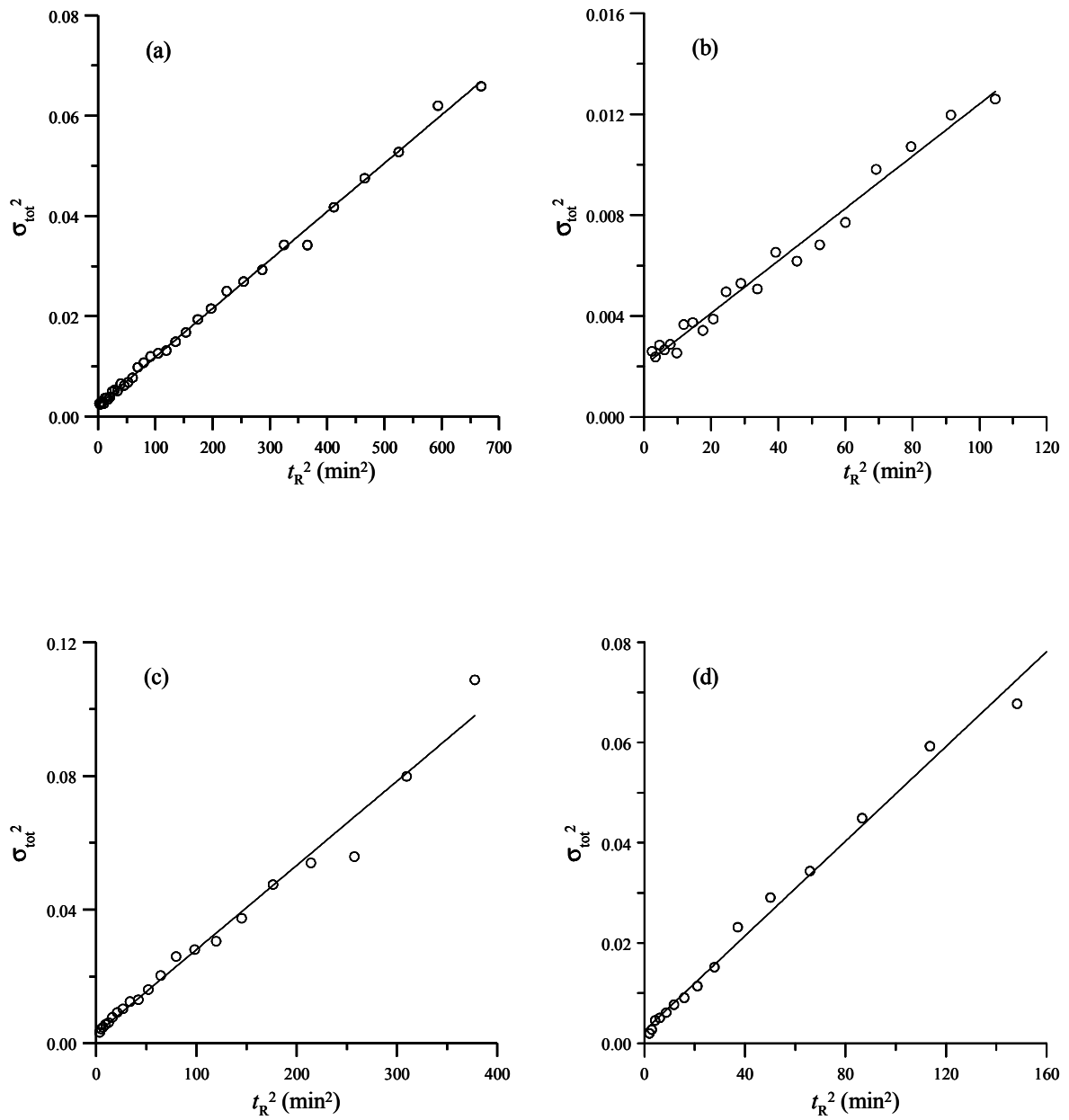


**Figura 4.3.** Dependencia de las semianchuras frontal ( $A$ , o) y de cola ( $B$ , •) con el tiempo de retención, para los picos utilizados en la construcción de los cromatogramas sintéticos (ver Sección 4.5.2). Fases móviles: (a,b) acetonitrilo-agua, (c) SDS/acetonitrilo, y (d) SDS.

La Figura 4.4 muestra la correlación entre la varianza total,  $\sigma_{\text{tot}}^2$  calculada según la Ecuación (4.33) y  $t_R^2$  para las fases móviles hidro-orgánicas y micelares. Se encontró una buena linealidad, similar a la encontrada utilizando las Ecuaciones (4.32) y (4.34) para el cálculo de la varianza.

Los resultados de las Tablas 4.1 y 4.2 confirman la exactitud de la Ecuación (4.48) para la estimación de la capacidad de pico, con errores de predicción en los intervalos comprendidos entre  $-3.0$  y  $+4.4\%$  y entre  $-1.1$  y  $+0.8\%$  para los modos hidro-orgánico y micelar, respectivamente. En contraste, el método clásico (Ecuación (4.39)), adaptado aquí para  $R_s = 1.5$ , generalmente sobreestimó el número de picos. Los errores de predicción con esta ecuación se situaron en los intervalos  $18.3$ – $33.8\%$  y  $6.7$ – $21.4\%$  para los modos hidro-orgánico y micelar, respectivamente. Es necesario indicar que los valores de eficacia necesarios para estimar la capacidad de pico a partir de la Ecuación (4.39) se obtuvieron mediante el ajuste de las anchuras de distintos picos a la Ecuación (4.6). Es sabido que, al menos en elución isocrática, las estimaciones proporcionadas por la Ecuación (4.39) son demasiado dependientes del pico. Así, por ejemplo, en el intervalo  $1.54$ – $25.87$  para el modo hidro-orgánico, la capacidad de pico estimada fue de  $18.0$ ,  $47.6$  y  $49.5$  al realizar el cálculo en base a las eficacias de los picos a  $1.54$ ,  $14.0$ , y  $25.9$  min. Encontrar los picos apropiados para obtener una anchura de pico representativa es difícil. De ahí la recomendación de promediar la eficacia a diferentes tiempos de retención, evitando los picos extremos.

De acuerdo a nuestra información, existen al menos tres ecuaciones publicadas que incluyen la dependencia de la eficacia con la retención en la estimación de la capacidad de pico (Ecuaciones (4.20), (4.23) y (4.27)). La integración de la Ecuación (4.20) es difícil. Por su parte, la Ecuación (4.27) no es práctica, y sus autores recomendaron el cálculo de un valor medio de la altura del plato teórico (Ecuación (4.28)). Por último, la Ecuación (4.23) (adaptada aquí para  $R_s = 1.5$ ) es fácil de aplicar y los resultados representan una mejora importante en relación a la exactitud proporcionada por la Ecuación (4.39), con errores en los intervalos  $7$ – $11.9\%$  y  $3.3$ – $5.7\%$ , para los modos hidro-orgánico y micelar, respectivamente.



**Figura 4.4.** Dependencia de la varianza total ( $\sigma_{\text{tot}}^2$ ) con el cuadrado del tiempo de retención ( $t_R^2$ ). Ver detalles en la Figura 4.3.

La Ecuación (4.23) se obtuvo suponiendo una dependencia lineal entre la anchura del pico a la mitad de su altura ( $w_{1/2}$ ) con el tiempo de retención [16]. En la Ecuación (4.48) o en la Ecuación (4.50) (ecuación simplificada), se supuso también una dependencia lineal, pero para las semianchuras al 10% de la altura del pico. A partir de la Ecuación (4.47), considerando picos simétricos ( $m_A = m_B = m_\sigma$ ):

$$T_0 = \frac{w_0}{2m_\sigma} = \frac{w_0}{a} \quad (4.60)$$

$$P_c = 1 + \frac{1}{z a} \ln \frac{a t_n + w_0}{a t_1 + w_0} \quad (4.61)$$

que es similar a la Ecuación (4.23). En las ecuaciones (4.60) y (4.61)  $w_0$  es la anchura del pico en el tiempo muerto.

Es interesante comentar dos diferencias entre la Ecuación (4.23) y las Ecuaciones (4.48) (o (4.50)):

- (i) Las Ecuaciones (4.48) y (4.50) son ecuaciones generales que pueden aplicarse a cualquier valor de resolución de pico, seleccionando tan sólo el correspondiente valor de  $z$ . La Ecuación (4.23) se obtuvo asumiendo exclusivamente la anchura del pico a mitad de la altura. Sin embargo, a esta altura, la deformación del pico debida a la asimetría es menos evidente que al 10% de la altura. Ésta es la razón que explica los mayores errores en la medida de la capacidad de pico mediante la Ecuación (4.23), en relación a la Ecuación (4.48).
- (ii) En las Ecuaciones (4.48) y (4.50), se utilizó  $t_i = t_{R,i} - t_0$  ( $t_i = t_{R,i} - T_0$ ), en lugar de  $t_{R,i}$  como en la Ecuación (4.23). Esto desplaza la escala de tiempos, de modo que para el tiempo muerto,  $t_i = 0$ , dando lugar a un signo positivo en las dependencias lineales dentro del término logarítmico. De este modo, la intersección posee un significado claro ( $w_0$ , la anchura del pico en el tiempo muerto).

Los métodos modificados de Grushka desarrollados para este trabajo (basados en la Ecuación (4.31), en combinación con las Ecuaciones (4.32), (4.33) o (4.34)) proporcionaron errores de predicción en los intervalos comprendidos entre  $-5.0$  y  $-11.4\%$ , entre  $0$  y  $+1.0\%$ , y entre  $-0.4$  y  $-3.6\%$ , respectivamente, para el modo hidro-orgánico, y entre  $-1.1$  y  $-8.0\%$ , entre  $-2.0$  y  $+2.3\%$ , y entre  $+0.5$  y  $+3.3\%$ , respectivamente, para el modo micelar (Tablas 4.1 y 4.2). Como se ha observado, los

mejores resultados se obtuvieron cuando la varianza total se midió de acuerdo a la Ecuación (4.33), mejorando ligeramente los resultados obtenidos con el método modificado de Giddings (Ecuación (4.48)).

Por último, el método simplificado basado en el promedio de las anchuras de los picos (Ecuación (4.56)) subestimó el número de picos, con errores en los intervalos 3–19.4% y 3.3–17.6% para los modos hidro-orgánico y micelar, respectivamente (Tablas 4.1 y 4.2). La razón de dicha subestimación es el mayor peso que se proporciona a los picos más anchos.

#### **4.5.4. Capacidad de pico para cromatogramas reales**

Finalmente, se estimó la capacidad de pico para varias combinaciones columna/fase móvil, haciendo uso de la información del perfil de pico obtenida para distintos compuestos de prueba. Las Tablas 4.3 y 4.4 muestran los resultados obtenidos con las Ecuaciones (4.39) y (4.48), y para la Ecuación (4.31) combinada con la Ecuación (4.33), para los sistemas hidro-orgánico y micelar, en una ventana de tiempo  $(t_R - t_0) = 2\text{--}17$  min. Decidimos tomar un pico inicial a los 2 min, ya que el comportamiento de la semianchura de cola ( $B$ ) no era lineal a tiempos cercanos a  $t_0$  (1.2 min), como se puede comprobar en las Figuras 4.1 y 4.3. Además, la medida de las semianchuras a tiempos próximos a  $t_0$  es bastante inexacta al 10% de la altura del pico.



**Tabla 4.3.** Estimación de la capacidad de pico para varios cromatogramas reales.<sup>a</sup>

Fase estacionaria / fase móvil (compuestos de prueba) <sup>b</sup>	$B/A$ <sup>c</sup>	$N$ <sup>c</sup>	Ec. (4.39) GI	Ec. (4.48) mGI	Ecs. (4.31)/(4.33) mGR
Hypersil C18 / 15% de metanol, pH 3 (sulfonamidas)	1.65	2665	17.2	16.0	16.2
Hypersil C18 / 20% de metanol, pH 3 (sulfonamidas)	1.70	1345	12.6	11.4	11.6
Hypersil C18 / SDS 0.025 M, pH 3 (sulfonamidas)	1.93	315	6.9	7.3	6.7
Hypersil C18 / SDS 0.025 M, 6% de acetonitrilo, pH 3 (sulfonamidas)	1.35	1330	11.9	12.0	11.5
Spherisorb C18 / 20–60% de acetonitrilo, pH 3 (celiprolol)	3.34	165	6.1	6.9	6.0
Spherisorb C18 / 17.5–25% de acetonitrilo, 0.1 M TEA, pH 3 (celiprolol)	2.10	1625	14.7	14.9	14.2
Spherisorb ODS–2 / SDS 0.10 M, 4% de pentanol, pH 7 (esteroides)	1.56	655	8.9	8.9	8.7
XTerra C18 / 15% de acetonitrilo, pH 3 (β-bloqueantes)	1.21	7035	25.3	22.6	23.2
Spherisorb ODS–2 / 60% de acetonitrilo, pH 3 (antidepresivos tricíclicos)	5.60	85	5.5	6.3	5.4

<sup>a</sup> La capacidad de pico se estimó en una ventana de tiempo entre 2 y 17 min. La anchura de pico se midió al 60% de la altura para la Ecuación (4.39), y al 10% para las Ecuaciones (4.48) y (4.31). Véase la Tabla 4.1 para las abreviaturas.

<sup>b</sup> La temperatura fue 25°C.

<sup>c</sup> Valores medios en la ventana de tiempo seleccionada.

**Tabla 4.4.** Estimación de la capacidad de pico para varios sistemas cromatográficos eluyendo conjuntos de diuréticos.<sup>a</sup>

Fase estacionaria / fase móvil <sup>b</sup>	$B/A$ <sup>c</sup>	$N$ <sup>c</sup>	Ec. (4.39) GI	Ec. (4.48) mGI	Ecs. (4.31)/(4.33) mGR
Zorbax SB C18 / 30% de acetonitrilo, pH 7, 30°C	1.07	6695	24.0	21.4	22.1
Zorbax SB C18 / 30% de acetonitrilo, pH 3, 60°C	1.13	7584	25.9	23.2	23.9
Zorbax SB C18 / 45% de acetonitrilo, pH 3, 30°C	1.06	7246	24.9	22.3	23.0
Kromasil C18 / SDS 0.02 M, pH 3	1.55	1486	12.9	12.2	12.2
Kromasil C18 / SDS 0.05 M, pH 3	1.70	1077	11.4	11.4	11.0
Kromasil C18 / SDS 0.15 M, pH 3	1.99	561	8.9	9.5	8.7
Kromasil C18 / SDS 0.05 M, 10% de acetonitrilo, pH 3	1.33	3632	18.9	17.5	17.7
Kromasil C18 / SDS 0.05 M, 10% de acetonitrilo, pH 7	1.39	3390	18.5	16.8	17.2
Kromasil C18 / SDS 0.05 M, 20% de acetonitrilo, pH 3	1.27	4980	21.7	18.4	19.1
Kromasil C18 / SDS 0.15 M, 10% de acetonitrilo, pH 3	1.15	3020	16.7	14.8	15.3

<sup>a</sup> La capacidad de pico se estimó en una ventana de tiempo entre 2 y 17 min. La anchura de pico se midió al 60% de la altura para la Ecuación (4.39), y al 10% para las Ecuaciones (4.48) y (4.31). Véase la Tabla 4.1 para las abreviaturas.

<sup>b</sup> La temperatura fue 25°C, a menos que se indique otra temperatura.

<sup>c</sup> Valores medios en la ventana de tiempo seleccionada.

## 4.6. Conclusiones

La capacidad de pico es un concepto útil, pero sólo puede ser accesible a través de cálculo, ya que está basado en una situación poco usual en la práctica: un cromatograma con picos bien distribuidos y resueltos, sin espacio entre ellos. Una estimación adecuada de la capacidad de pico requiere del conocimiento de la relación entre la anchura de los picos y el tiempo de retención. Se han propuesto diversas ecuaciones para realizar estas estimaciones, que se han resumido bajo tres perspectivas diferentes, representadas por la Ecuación (4.1) (método intuitivo), la Ecuación (4.7) (método de Giddings) y la Ecuación (4.18) (método de Grushka). El método intuitivo asume la misma anchura para todos los picos del cromatograma, mientras que en las ecuaciones originales propuestas por Giddings y Grushka, la eficacia se mantiene invariable con el tiempo de retención. Sin embargo, estas suposiciones pueden conducir a estimaciones incorrectas.

No es fácil encontrar cromatogramas reales que sigan la definición de la capacidad de pico. Por lo tanto, comprobamos las estimaciones de la capacidad de pico sobre cromatogramas sintéticos contruïdos con picos reales. Se comprobó que la ecuación clásica para la estimación de la capacidad de pico (Ecuación (4.39)) tiende a dar sobreestimaciones, con errores menores para ventanas de tiempo que incluyen un número de picos más bajo. Así, es interesante observar cómo en los ejemplos de RPLC micelar, donde las eficacias eran menores, los errores encontrados fueron más pequeños.

No es sencilla la incorporación adecuada de los cambios en la anchura del pico con el tiempo de retención para el método modificado de Giddings, ni para el de Grushka. Por una parte, la ecuación que relaciona la varianza total del pico,  $\sigma_{\text{tot}}^2$ , con  $t_R^2$  no es compatible con el método de Giddings, y deben utilizarse ecuaciones lineales aproximadas entre cada semianchura de pico y el tiempo de retención. Sin embargo, la magnitud de la curvatura de la parábola dibujada por  $\sigma_{\text{tot}}$  frente a  $t_R$  parece ser bastante pequeña y puede considerarse como una línea recta (Figuras 4.1 y 4.3). Se ha comprobado que esta dependencia aproximadamente lineal es útil en la predicción del perfil de pico, de interés en la optimización de la selectividad cromatográfica [21]. Por otro lado, la estimación de la desviación estándar para un pico asimétrico no es sencilla, y se deben utilizar diferentes aproximaciones. Nosotros hemos aplicado tres alternativas (Ecuaciones (4.32) a (4.34)). A pesar de las limitaciones comentadas, ambos métodos, la

Ecuación (4.31) combinada con la Ecuación (4.33), y la Ecuación (4.48) parecen proporcionar estimaciones bastante exactas de la capacidad del pico.

La medida de la anchura del pico se realizó al 10% de la altura para considerar mejor la deformación del pico. Cabe remarcar que la ecuación final obtenida a partir del método de Giddings modificado coincide con la obtenida con un método previo de Grushka modificado (Ecuación (4.23)), donde se considera una aproximación lineal entre la desviación estándar y el tiempo de retención, con la restricción de que las anchuras de los picos deben medirse al 10% de la altura del pico.

Las ecuaciones propuestas previamente para la estimación de la capacidad de pico, que incorporan la dependencia de la eficacia con el tiempo de retención (como los ejemplos dados en este trabajo: Ecuaciones (4.20), (4.23) y (4.28)), se propusieron en base al método de Grushka. Estas ecuaciones, junto con la Ecuación (4.31) desarrollada por nosotros, no permiten la inclusión de la deformación del pico como lo hace el método de Giddings (Ecuación (4.48)). Sin embargo, debe observarse que en la ecuación simplificada (Ecuación (4.50)), la diferencia entre las semianchuras ya no se manifiesta. Esto también ocurre para la Ecuación (4.56). Este hecho, junto con los bajos errores proporcionados por la Ecuación (4.50), conduce a la conclusión de que la anchura del pico (y no su deformación) es el factor relevante, al menos en los ejemplos estudiados. Sin embargo, en otras situaciones (como para picos electroforéticos altamente deformados), la asimetría podría ser un factor importante.

## 4.7. Referencias

1. U.D. Neue, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 107.
2. D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan, J. Chromatogr. A 1168 (2007) 3.
3. J.C. Giddings, Anal. Chem. 39 (1967) 1027.
4. A. Mico Tormos, C. Collado Soriano, J.R. Torres Lapasió, E. Simó Alfonso, G. Ramis Ramos, J. Chromatogr. A 1180 (2008) 32.
5. J.M. Davis, J.C. Giddings, Anal. Chem. 55 (1983) 418.
6. E. Grushka, Anal. Chem. 42 (1970) 1142.
7. K. Lan, J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 71 (1999) 709.

8. J.C. Medina, N. Wu, M.L. Lee, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1301.
9. P. Jandera, K. Novotná, L. Kolárová, J. Fisher, *Chromatographia* 60 (2004) S27.
10. M. Gilar, A.E. Daly, M. Kele, U.D. Neue, J.C. Gebler, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 183.
11. S.A.C. Wren, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 337.
12. U.S. Neue, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 153.
13. H. Liu, J.W. Finch, M.J. Lavalley, R.A. Collamati, C.C. Benevides, J.C. Gebler, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 30.
14. J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, T.J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 1.
15. J. Krupcik, J. Garaj, P. Cellar, G. Guiochon, *J. Chromatogr.* 312 (1984) 1.
16. Y. Shen, M.L. Lee, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3853.
17. D. Cabooter, A. de Villiers, D. Clicq, R. Szucs, P. Sandra, G. Desmet, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 183.
18. H. A. Claessens, C.A. Cramers, M.A.J. Kuyken, *Chromatographia* 23 (1987) 189.
19. A. Prüss, C. Kempter, J. Gysler, T. Jira, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 129.
20. J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.
21. J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
22. J.J. Baeza Baeza, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 119.
23. M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *Micellar Liquid Chromatography*; Marcel Dekker, Nueva York (2000) Vol. 83.
24. S. López Grío, M.C. García Álvarez-Coque, W.L. Hinze, F.H. Quina, A. Berthod, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4826.
25. S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 187.
26. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.



## Capítulo 5

### **Efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura sobre el comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables**

#### **5.1. Resumen**

El contenido de disolvente orgánico y pH en la fase móvil son los factores experimentales que se controlan con más frecuencia en cromatografía líquida en fase inversa, debido a sus importantes efectos sobre la retención y/o la selectividad. La temperatura no suele considerarse como un factor a optimizar. Sin embargo, incluso en los casos en los que el impacto de este factor sobre la selectividad no sea significativo, la reducción en el tiempo de análisis puede aconsejar tenerlo en cuenta. Además, los compuestos ionizables pueden presentar cambios en su selectividad, debido a la interacción del disolvente orgánico y/o la temperatura con el pH. En este capítulo, se muestra la separación de compuestos ionizables: nueve diuréticos (bendroflumetiazida, benzotiazida, bumetanida, clortalidona, furosemida, piretanida, probenecid, triclorometiazida y xipamida), y dos  $\beta$ -bloqueantes (oxprenolol y propranolol), que poseen distintos comportamientos ácido-base. Para ello, se utilizó una columna Zorbax SB-C18 y un amplio intervalo de condiciones experimentales: 25–45% (v/v) de acetonitrilo, pH 3–7 y 20–50°C. Se desarrollaron modelos que consideran dos factores (disolvente orgánico/pH y temperatura/pH) y tres factores (disolvente orgánico/pH/temperatura), basados en una ecuación descrita en la bibliografía que considera las polaridades del soluto, fase estacionaria y fase móvil. Esto permitió el desarrollo de un método exhaustivo para predecir la retención y la modificación del comportamiento ácido-base (i.e. la determinación de las constantes de protonación y desplazamiento de las curvas retención versus pH) de los once compuestos, así como los cambios en la selectividad dentro del dominio experimental considerado.

## 5.2. Introducción

Cuando un cromatografista aborda un nuevo problema de separación, debe adoptar algunas decisiones relacionadas con factores no continuos (e.g. la columna y la naturaleza del disolvente orgánico y del tampón), basándose a menudo en conocimientos previos o en estudios exploratorios. En la siguiente etapa, examina con más detenimiento factores continuos fácilmente ajustables, con un efecto importante sobre la selectividad y otras propiedades (i.e. la retención). En cromatografía en fase inversa (*reversed phase liquid chromatography*, RPLC), estos factores son generalmente la concentración de disolvente(s) orgánico(s), el pH y la temperatura, y deberían ser fijados a los valores óptimos para garantizar el éxito de la separación. En este sentido, un modo altamente fiable para conocer el comportamiento cromatográfico es la predicción con ordenador basada en modelos [1].

El contenido de disolvente orgánico es el factor más utilizado en la práctica debido a su conveniencia y efectos de moderados a intensos sobre la retención, la selectividad y las propiedades de pico para cualquier tipo de soluto. En el caso de los compuestos ionizables, existe otro factor con un impacto sobre la selectividad todavía mayor: el pH, que origina cambios súbitos en la retención, originando múltiples cruces [2–4]. En contraposición a ello, los beneficios aportados por la temperatura son menos claros. El uso de temperaturas elevadas disminuye los tiempos de retención, pero también aumenta la difusión de los solutos, lo que empobrece la resolución en mayor o menor grado [5]. A pesar de ello, algunos autores han descrito incrementos en la eficacia de los picos con la temperatura [6].

Por otro lado, la relación entre la retención y la temperatura (la pendiente de la ecuación de Van't Hoff) para diferentes compuestos puede ser lo bastante distinta como para modificar de forma significativa la selectividad, originando ocasionalmente cambios en el orden de elución [7–10]. En términos generales, los cambios en la selectividad asociados a la temperatura son mayores para los compuestos polares o ionizables [5,7,11]. Estos cambios son también particularmente intensos para las moléculas grandes, como las proteínas, que son capaces de adoptar distintas conformaciones al cambiar la temperatura [10]. Aunque generalmente no influye tanto sobre la selectividad como el contenido de modificador orgánico o el pH, la temperatura es un factor muy valioso a



considerar en el desarrollo de un método [5,12–14], ya que origina reducciones importantes en el tiempo de análisis [15].

Los efectos de la fuerza eluyente y de la temperatura sobre la selectividad son aproximadamente ortogonales [5]. Sin embargo, en el caso de los solutos ionizables, cabe esperar interacciones entre el contenido de disolvente orgánico y el pH, y la temperatura y el pH. La intensidad de estas interacciones complica la modelización de la retención y puede impedir un aprovechamiento pleno del uso combinado de los tres factores. Además, un único diseño experimental debería satisfacer los requisitos de información para más de un soluto simultáneamente, lo que hace crítica la construcción del diseño experimental (i.e. la localización de los puntos dentro del diseño). Lamentablemente, existe un vacío en la bibliografía en lo que respecta al uso combinado de los tres factores, y por lo tanto, quedan todavía por desarrollar las estrategias que lo permitan.

En este capítulo, se presenta un modelo de retención que tiene en cuenta todas estas interacciones, y que es válido en intervalos amplios de los factores experimentales. Dicho modelo se ha validado con un conjunto de once compuestos (nueve diuréticos y dos  $\beta$ -bloqueantes), que presentan un amplio espectro de comportamientos ácido-base. Los compuestos seleccionados representan diferentes situaciones en términos de información suministrada por el diseño experimental. Así, algunos solutos quedaron deficientemente muestreados por el diseño experimental, mientras que para otros éste cubrió el intervalo completo de disociación. En la práctica cromatográfica, son muy frecuentes los casos donde el diseño experimental sólo muestrea parcialmente la protonación, problema que no debería ser ignorado en el desarrollo del método, limitándose a los solutos que quedan bien cubiertos por el diseño experimental. El objetivo aquí desarrollado es estudiar en profundidad todos estos problemas, junto con los efectos del contenido de disolvente orgánico y la temperatura sobre el proceso de protonación. Para ello, se ha realizado un diseño experimental exhaustivo que aseguró la ausencia de sesgo en todo el dominio considerado.

### 5.3. Parte experimental

#### 5.3.1. Reactivos

Las fases móviles se prepararon con acetonitrilo (grado HPLC, Scharlab, Barcelona), en el intervalo 25–45% (v/v) y se tamponaron con ácido cítrico 0.1 M (Panreac, Barcelona) y NaOH 1 M (Scharlab) en el intervalo de pH = 3–7. El electrodo se calibró a partir de tampones acuosos, y el pH de las fases móviles se midió tras la adición del disolvente orgánico (i.e. escala  $^s_w \text{pH}$ ) [16].

Los compuestos ionizables estudiados fueron nueve diuréticos: benzotiazida, bumetanida, furosemida, probenecid, triclorometiazida (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), bendroflumetiazida (Davur, Madrid), clortalidona (Ciba-Geigy, Barcelona), piretanida (Cusi, Barcelona) y xipamida (Lacer, Barcelona), y dos  $\beta$ -bloqueantes: oxprenolol (Ciba-Geigy) y propranolol (Aldrich, Steinheim, Alemania). Estos fármacos se disolvieron con unos pocos mililitros de metanol (grado analítico, Prolabo, Valencia), sometiéndose a un baño de ultrasonidos durante unos minutos y diluyéndose finalmente con agua. Las concentraciones de las disoluciones madre y de las disoluciones inyectadas fueron  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente y se almacenaron en la oscuridad, a  $4^\circ\text{C}$ . El volumen de inyección fue siempre de  $5 \mu\text{l}$ .

Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.) para preparar todas las disoluciones. Las fases móviles y las disoluciones de los compuestos de prueba se filtraron a través de membranas de nylon (Osmonics, Herental, Bélgica), con un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$ , y un diámetro de 47 mm (Magna) y 17 mm (Cameo), respectivamente.

#### 5.3.2. Instrumentación

El sistema de HPLC que se utilizó (Agilent, Serie 1100, Waldbronn, Alemania) constaba de una bomba isocrática, un muestreador automático, un detector UV-visible y un controlador de la temperatura. Las señales se monitorizaron a 254 nm. Las separaciones se llevaron a cabo con una columna Zorbax SB-C18 ( $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula, Agilent), protegida con una precolumna de características

similares ( $30 \times 4.0$  mm,  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula). Se operó a temperaturas dentro del intervalo  $20\text{--}50^\circ\text{C}$ . El flujo, en todos los casos, se fijó a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Se realizaron inyecciones por triplicado. En estudios preliminares se utilizó también una columna Spherisorb ODS-2 (Scharlab).

La adquisición de datos se realizó con una estación de datos de Agilent (HPChemStation). Los algoritmos de modelización se desarrollaron con MATLAB 6.5 (The Mathwork, Natick, MA, EE.UU.), Visual Basic 6.0 y Excel XP (Microsoft, Seattle, WA, EE.UU.).

## 5.4. Descripción de la retención

Se desarrollaron modelos basados en la separación de las contribuciones de polaridad del soluto, fase estacionaria y fase móvil, utilizando como factores la concentración de protones, la temperatura y el contenido de disolvente orgánico.

### 5.4.1. Influencia del pH sobre la retención

La retención de los compuestos ionizables es una media ponderada de la retención de las formas ácida y básica puras [2]:

$$k = k_A \delta_A + k_{HA} \delta_{HA} = k_A \frac{1}{1 + K h} + k_{HA} \frac{K h}{1 + K h} = \frac{k_A + k_{HA} K h}{1 + K h} \quad (5.1)$$

donde  $K$  es la constante ácido-base expresada en el sentido de la protonación (i.e. la inversa de la constante de disociación,  $K_a^{-1}$ ),  $h$  la concentración de protones,  $k$  el factor de retención observado, y  $k_A$  y  $k_{HA}$  son los factores de retención para las especies básica y ácida, respectivamente. Debido a que la retención intrínseca para cada especie ( $k_A$  y  $k_{HA}$ ) es distinta, se observará un cambio súbito en la retención a valores de pH próximos al valor de  $\log K$  en la fase móvil. La Ecuación (5.1) puede ser reescrita de la siguiente manera:

$$k = \frac{k_A + K h}{1 + K h} k_{HA} = \frac{f + K h + f K h - f K h}{1 + K h} k_{HA} = \left( f + \frac{K h}{1 + K h} (1 - f) \right) k_{HA} \quad (5.2)$$

donde  $f$  representa el cociente  $k_A/k_{HA}$ , que es  $<1$  para los compuestos ácidos, y  $>1$  para los compuestos básicos. Esta transformación permite un mejor comportamiento en los ajustes. Finalmente, se obtiene:

$$\log k = \log k_{HA} + \log \left( f + \frac{10^{\log K} h}{1 + 10^{\log K} h} (1 - f) \right) \quad (5.3)$$

#### **5.4.2. La retención en función del pH y la temperatura**

La influencia de la temperatura puede expresarse mediante la ecuación de Van't Hoff [15]:

$$\log k = \frac{\Delta S}{2.3 R} - \frac{\Delta H}{2.3 R T} + \log \Phi \quad (5.4)$$

donde  $T$  es la temperatura absoluta,  $\Delta H$  y  $\Delta S$  son el incremento de entalpía y entropía del sistema, respectivamente,  $R$  es la constante universal de los gases ideales, y  $\Phi$  la relación de fases. La Ecuación (5.4) puede ser rescrita como:

$$\log k = c_0 + \frac{c_1}{T} \quad (5.5)$$

que se ha comprobado ser válida para intervalos de hasta 90°C en RPLC [5]. Puede escribirse una relación similar para la constante de protonación, aceptando la dependencia general que puede establecerse entre cualquier constante de equilibrio y la temperatura:

$$\log K = c_0 + \frac{c_1}{T} \quad (5.6)$$

Se combinaron las Ecuaciones (5.3), (5.5) y (5.6) para tener en cuenta los efectos conjuntos del pH y de la temperatura sobre la retención:

$$\log k = c_1 + \frac{c_2}{T} + \log \left( c_3 + \frac{10^{c_4 + \frac{c_5}{T}} h}{1 + 10^{c_4 + \frac{c_5}{T}} h} (1 - c_3) \right) \quad (5.7)$$

En la Ecuación (5.7),  $c_i$  son coeficientes de regresión a determinar mediante ajuste, que adoptan valores característicos para un determinado soluto y sistema separador.

### 5.4.3. La retención en función del contenido de disolvente orgánico y del pH

En RPLC con mezclas binarias agua-disolvente orgánico, el comportamiento de retención puede ser descrito mediante [1]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \varphi^2 \quad (5.8)$$

donde  $\varphi$  es la fracción volumétrica de disolvente orgánico (v/v), y  $c_{0-2}$  son los parámetros de regresión. El término cuadrático puede eliminarse en intervalos estrechos de contenido de disolvente orgánico, lo que da lugar a una relación lineal:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi \quad (5.9)$$

También es posible describir adecuadamente la retención con un modelo lineal que separa las contribuciones polares de los distintos agentes implicados en el sistema de separación (i.e. el soluto, la fase estacionaria y la fase móvil):

$$\log k = (\log k)_0 + p_s (P_m^N - P_s^N) \quad (5.10)$$

donde  $p_s$  y  $P_m^N$  son descriptores asociados a la polaridad del soluto y de la fase móvil respectivamente, y  $(\log k)_0$  y  $P_s^N$  describen las características de polaridad de la fase estacionaria.  $P_m^N$  y  $P_s^N$  son parámetros de polaridad normalizados, mientras que el término  $(\log k)_0$  representa la retención en una fase móvil hipotética con la misma polaridad que la fase estacionaria. Para mezclas de acetonitrilo-agua:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.068\varphi}{1 + 1.341\varphi} \quad (5.11)$$

Cuando  $(\log k)_0$  y  $P_s^N$  se ajustan individualmente para cada soluto, la Ecuación (5.10) posee un nivel de exactitud comparable al del modelo cuadrático (Ecuación (5.8)) [17]. Combinando ahora la Ecuación (5.3) con la Ecuación (5.10) para tener en cuenta los efectos conjuntos del contenido de disolvente orgánico y pH, se llega a:

$$\log k = c_1 + c_2 P_m^N + \log \left( c_3 + \frac{10^{c_4 + c_5 \varphi} h}{1 + 10^{c_4 + c_5 \varphi} h} (1 - c_3) \right) \quad (5.12)$$

En esta expresión se asume que la constante de protonación varía linealmente con el contenido de disolvente orgánico. Esta hipótesis se ha adoptado por su simplicidad y

puede resultar insuficiente en algunas situaciones [2]. La Ecuación (5.12) fue propuesta y validada en un trabajo previo [4].

#### **5.4.4. La retención en función del contenido de disolvente orgánico, el pH y la temperatura**

El efecto combinado de los tres factores puede expresarse mediante la siguiente ecuación de ocho parámetros ( $c_1$ – $c_8$ ):

$$\log k = c_1 + \frac{c_2}{T} + c_3 P_m^N + \log \left( c_4 + \frac{10^{c_5 + c_6 \phi + \frac{c_7}{T} + c_8 \frac{\phi}{T}} h}{1 + 10^{c_5 + c_6 \phi + \frac{c_7}{T} + c_8 \frac{\phi}{T}} h} (1 - c_4) \right) \quad (5.13)$$

Las Ecuaciones (5.7) y (5.12) son casos particulares del caso general descrito por la Ecuación (5.13).

### **5.5. Resultados y discusión**

#### **5.5.1. Consideraciones sobre el diseño experimental**

Se estudió el efecto conjunto de los tres factores (i.e. contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura) sobre el comportamiento de retención de nueve diuréticos (benzotiazida, bumetanida, furosemida, probenecid, triclorometiazida, bendroflumetiazida, clortalidona, piretanida, y xipamida), y dos  $\beta$ -bloqueantes (oxprenolol y propranolol). Siete de estos compuestos son débilmente ácidos, por lo que la especie ácida (la especie neutra) es la retenida: benzotiazida, bumetanida, furosemida, probenecid, triclorometiazida, piretanida, y xipamida. Los otros cuatro compuestos son bases débiles, por lo que se retiene preferentemente la especie básica: bendroflumetiazida, clortalidona, oxprenolol y propranolol. La Tabla 5.1 recoge las constantes de protonación en agua,  $\log K$  (que se encuentran en el intervalo 3.4–9.3) y los logaritmos del coeficiente de reparto octanol-agua,  $\log P_{o/w}$  (0.24–2.6).

**Tabla 5.1.** Constantes de protonación en agua a 25°C y coeficientes de reparto octanol-agua.

Compuesto	$\log K^a$	$\log P_{o/w}^b$
Bendroflumetiazida	9.0	1.95
Benzotiazida	6.0	1.73
Bumetanida	3.6, 7.7	2.09
Clortalidona	9.3	0.24
Furosemida	3.8, 7.5	1.81
Oxprenolol	9.5	1.83
Piretanida	4.1	2.20
Probenecid	3.4	1.40
Propranolol	9.5	2.60
Triclorometiazida	7.3, 8.6, 10.6	1.00
Xipamida	4.8, 10.0	2.19

<sup>a</sup> Referencias [17,18]

<sup>b</sup> Referencia [19]

Antes de proceder al estudio formal era necesario verificar la estabilidad de la fase estacionaria. Así, durante 24 horas se realizaron inyecciones repetidas de algunos compuestos en dos columnas, una Spherisorb ODS-2 y una Zorbax SB-C18, termostatzadas a 50°C. Debe indicarse que ésta es precisamente la temperatura máxima recomendada por el fabricante para la columna Spherisorb ODS-2, mientras que la columna Zorbax SB-C18 puede operar, en principio, hasta temperaturas cercanas a 90°C. Tal y como se esperaba, las variaciones observadas en la retención tras el estrés térmico

fueron sólo despreciables ( $\Delta t_R < 0.01$  s) para la segunda columna. Por lo tanto, sólo ésta poseía la estabilidad requerida para desarrollar estudios de optimización teniendo en cuenta la temperatura. Debe indicarse que tras operar durante meses a temperaturas de 50°C, no se observó ningún deterioro significativo en la columna seleccionada. Otra característica interesante de esta columna, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, es que el soporte de sílice minimiza la adsorción de los compuestos básicos, lo que reduce la cola de los picos cromatográficos.

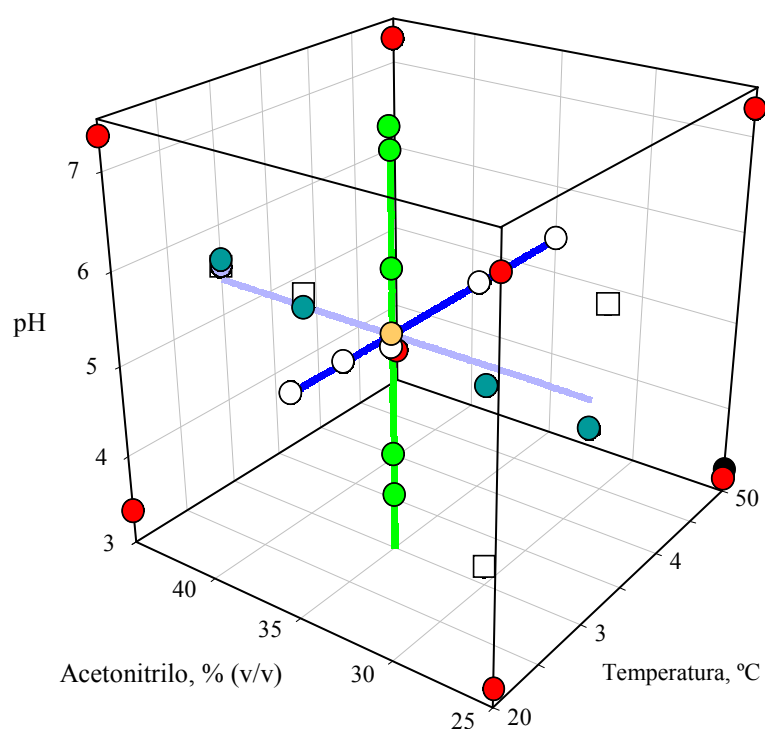
Los intervalos de trabajo para los tres factores experimentales incluidos en el estudio de modelización se establecieron atendiendo a los resultados que proporcionó un número reducido de experiencias de *screening* previas (señaladas gráficamente como cuadrados en la Figura 5.1). Las medidas realizadas se utilizaron para construir modelos preliminares para predecir de forma aproximada los valores de retención. El pH se mantuvo en el intervalo 3–7. Este intervalo es más conservador que los límites operativos recomendados por el fabricante (pH 1–8), puesto que se esperaba que la degradación de la columna se viera exaltada a valores de pH extremos, cuando se operase a temperaturas elevadas. Finalmente, con el fin de garantizar valores de retención adecuados, se seleccionaron los siguientes intervalos de trabajo para los otros dos factores: 25–45% (v/v) de acetonitrilo y 20–50°C.

Se tamponó el pH con el sistema del ácido cítrico, cuyas constantes de protonación para 20, 30, 40 y 50% (v/v) de acetonitrilo son las siguientes:  $\log K_1 = 6.03, 6.18, 6.35$  y  $6.41$ ;  $\log K_2 = 4.76, 4.94, 5.14$  y  $5.35$ ; y  $\log K_3 = 3.32, 3.51, 3.72$ , y  $3.95$ , respectivamente [16]. Por lo tanto, se puede concluir que el sistema del ácido cítrico es adecuado para amortiguar el pH en el intervalo de trabajo seleccionado para las mezclas de acetonitrilo-agua, ya que se considera que un sistema ácido-base proporciona una buena capacidad reguladora en el intervalo de  $\text{pH} = \log K \pm 1$ . También debe llamarse la atención sobre el hecho de que con ácido cítrico, se consigue que un único sistema regulador actúe en todo el dominio experimental, lo que evita problemas asociados a cambios en la naturaleza del tampón.

Tras establecer intervalos apropiados para cada factor, se desarrollaron nuevas experiencias para modelizar la retención. Éstas se llevaron a cabo siguiendo aproximadamente un diseño central compuesto (Figura 5.1). Algunos puntos experimentales se replicaron para verificar posibles derivas o la existencia de respuestas



inestables. Se utilizó toda la información disponible (correspondiente a 34 fases móviles) en el proceso de modelización. Debe señalarse que el propósito del diseño experimental era muestrear el espacio de los factores tan exhaustivamente como fuera posible, a fin de describir con detalle el comportamiento del sistema.



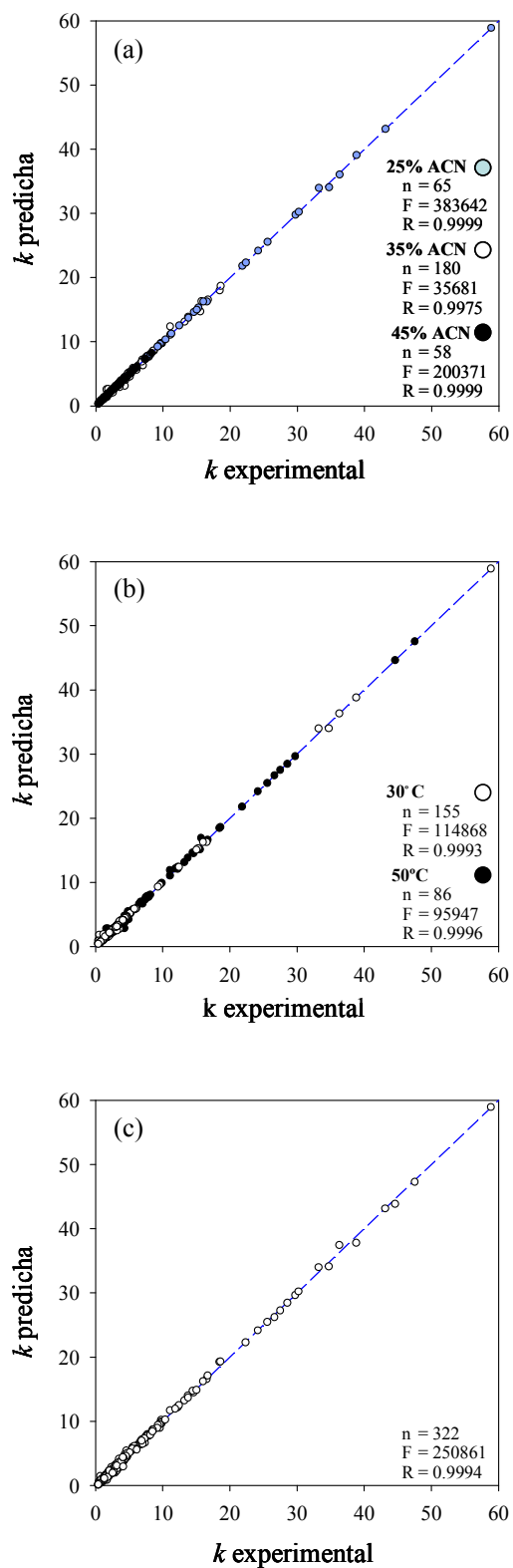
**Figura 5.1.** Diseño experimental en el que se señalan las experiencias preliminares llevadas a cabo para establecer los intervalos de los factores (cuadrados), las experiencias que delimitan el cubo y las experiencias estrella.

### 5.5.2. Modelización de la retención

Las 322 medidas de retención disponibles correspondientes a los once compuestos de prueba se ajustaron no linealmente a la Ecuación (5.7) (factores: pH y  $T$ ), Ecuación (5.12) (factores:  $\varphi$  y pH) y Ecuación (5.13) (factores:  $\varphi$ , pH y  $T$ ). Los ajustes se llevaron a cabo usando el método de Powell [21]. Este algoritmo tiene la característica de converger muy rápidamente cerca del óptimo local (i.e. convergencia cuadrática), al igual que los procedimientos de ajuste basados en derivadas, con todas sus ventajas, pero con una mayor estabilidad. Las desviaciones estándar de los parámetros se calcularon numéricamente, evaluando las derivadas locales alrededor de la solución encontrada por el algoritmo.

Debe llamarse la atención sobre el hecho de que las Ecuaciones (5.7) y (5.12) sólo pudieron ajustarse para ciertos niveles de  $\varphi$  y  $T$ , respectivamente. De este modo, se dispuso de 303 (65, 180 y 58 puntos a 25, 35 y 45% de acetonitrilo, respectivamente), y 241 puntos experimentales (155 y 86 puntos a 30 y 50°C, respectivamente) distribuidos por niveles, que pudieron ser ajustados a modelos parciales.

La Figura 5.2 muestra los gráficos de correlación (i.e. factor de retención experimental versus predicho por el modelo) para las tres ecuaciones indicadas: (a) Ecuación (5.7) a tres niveles de disolvente orgánico (25, 35 y 45%), (b) Ecuación (5.12) a dos niveles de temperatura (30 y 50°C), y (c) Ecuación (5.13) incluyendo todo el conjunto de experimentos ( $n = 322$ ). Como se puede observar, los ajustes son satisfactorios. La Figura 5.2a muestra que la descripción de la dependencia de la retención con el pH y la temperatura es totalmente satisfactoria, mientras que la descripción para el contenido de disolvente orgánico y el pH (Figura 5.2b) es satisfactoria, aunque ligeramente peor a retenciones bajas. La exactitud que proporciona la Ecuación (5.13) puede considerarse excelente (Fig. 3.2c) para realizar predicciones, como las requeridas en la optimización de la selectividad.



**Figura 5.2.** Gráficos de correlación correspondientes al ajuste de los factores de retención de los once compuestos de prueba: (a) Ecuación (5.7), (b) Ecuación (5.12), y (c) Ecuación (5.13). Se proporcionan algunos estadísticos: número de puntos ( $n$ ), el valor de la  $F$  de Fisher ( $F$ ), y el coeficiente de correlación ( $R$ ).

Las Figuras 5.3 y 5.4 muestran algunas secciones representando  $k$  versus pH extraídas de la hipersuperficie de retención para seis solutos representativos. En la Figura 5.3, la temperatura se mantiene constante a 30°C, y se proporciona la retención correspondiente a cuatro niveles de acetonitrilo (25, 30, 35 y 40%), mientras que en la Figura 5.4 se mantiene constante el contenido de disolvente orgánico a un 35% de acetonitrilo y los niveles de temperatura corresponden a 20, 30, 40 y 50°C. Los puntos experimentales disponibles asociados a los niveles mencionados aparecen superpuestos. Los gráficos demuestran la buena exactitud proporcionada por el modelo completo (Ecuación (5.13)).

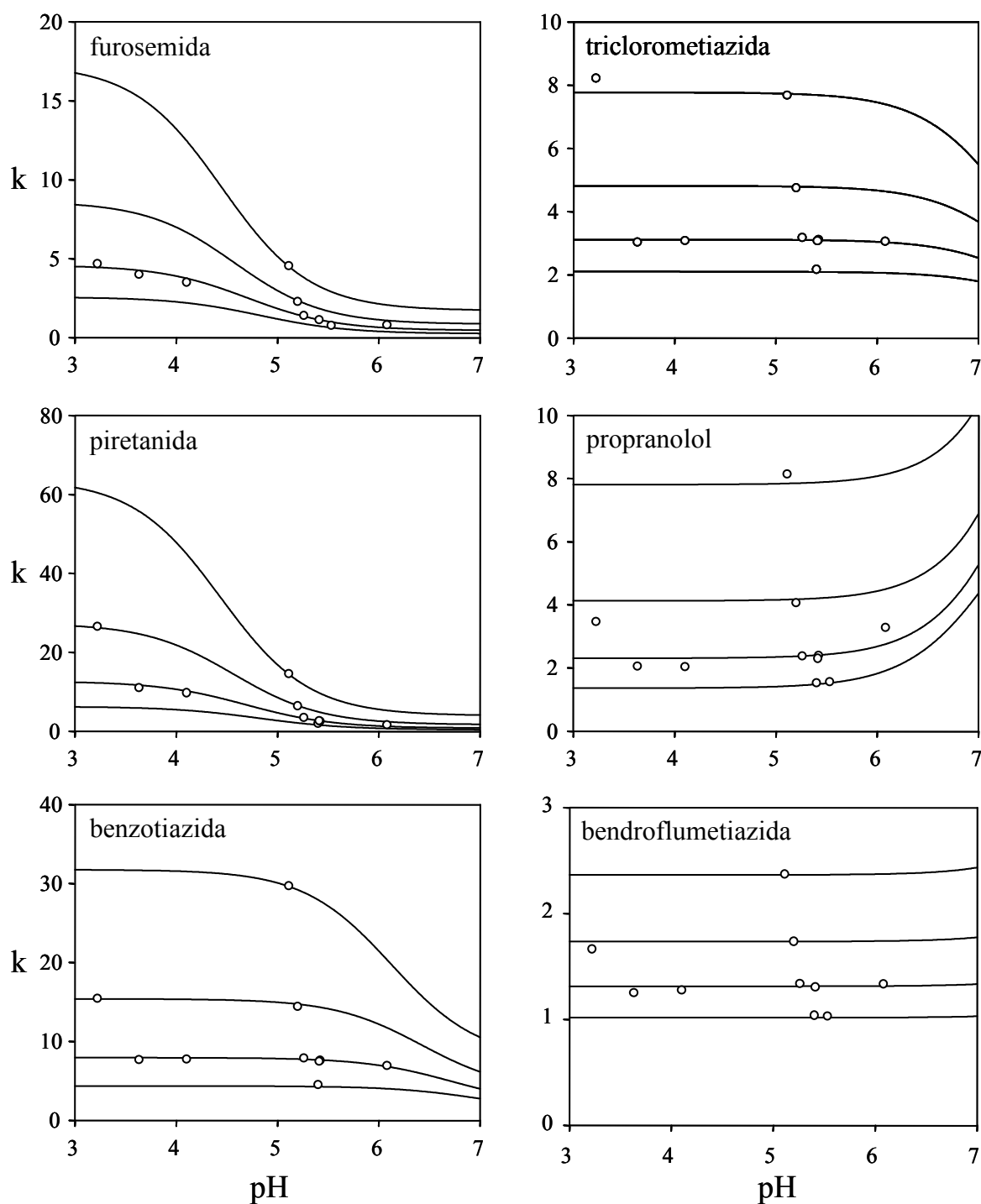
Sin embargo, no es suficiente lograr una buena correlación entre los resultados experimentales y los predichos. Por un lado, deben existir algunos grados de libertad (df) para garantizar que el modelo está generalizando adecuadamente el comportamiento del sistema, evitando sobreajustes. Por otro lado, el modelo no debe ser sesgado. En este sentido, la Ecuación (5.13) presenta diversas ventajas:

- (i) El número de parámetros es bastante económico: en teoría, ocho experimentos “perfectos” serían suficientes para el ajuste, aunque esto significaría que  $df = 0$ .
- (ii) El modelo que se propone está sustentado teóricamente, lo que le confiere una capacidad de extrapolación moderada para obtener información sobre la retención de las especies ácidas y básicas.
- (iii) Relacionado con el punto anterior se halla la inclusión de términos de interacción, lo que es más difícil con modelos empíricos, no apoyados teóricamente. La Ecuación (5.13) facilita dicha inclusión.

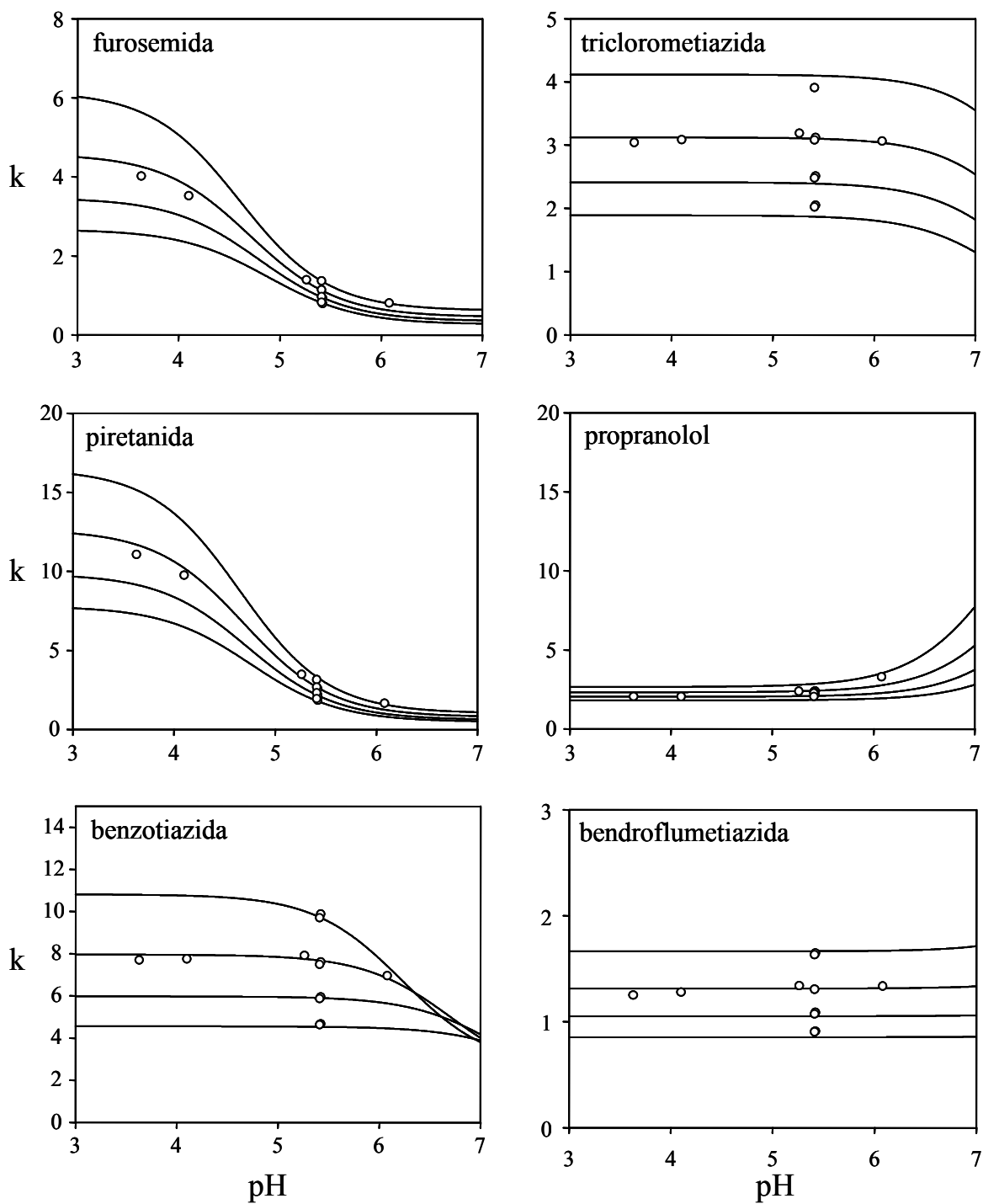
Las estimaciones iniciales para algunos parámetros pueden obtenerse fácilmente a partir de resultados experimentales, o de datos de la bibliografía.

Con el fin de establecer la validez estadística de los ocho parámetros del modelo ( $c_{i,j}$ ) en la Ecuación (5.13), se calcularon los intervalos de confianza (CI) al 95%, para cada soluto  $j$ . A partir de ellos se calcularon las incertidumbres relativas ( $CI_{rel,i,j}$ ):

$$CI_{rel,i,j} = 100 \frac{CI_{i,j}}{c_{i,j}} \quad (5.14)$$



**Figura 5.3.** Efecto del contenido de acetonitrilo y el pH sobre la retención de varios compuestos ionizables. El contenido de acetonitrilo para cada soluto (de arriba abajo) es 25, 30, 35 y 40% (v/v), y la temperatura, 30°C. Las líneas corresponden a predicciones y los círculos son valores experimentales. La información para la región del salto (i.e. cambio súbito en la retención) viene avalada por experiencias en otras regiones del diseño experimental.



**Figura 5.4.** Efecto del pH y de la temperatura sobre la retención de varios compuestos ionizables. La temperatura para cada soluto (de arriba a abajo) es 20, 30, 40 y 50°C y el contenido de acetonitrilo, 35% (v/v). Véase la Figura 5.3 para otros detalles.

Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la significancia estadística depende de la información aportada por el diseño experimental para el soluto ajustado, y en ocasiones (e.g. triclorometiazida y oxprenolol), el diseño era escasamente informativo respecto al comportamiento de las especies básicas. Por este motivo, se proporcionan las medianas de las incertidumbres relativas, considerando todo el conjunto de solutos:  $CI_{rel,ij}(\%) = 18.0 (c_1), 8.4 (c_2), 4.9 (c_3), 16.9 (c_4), 3.5 (c_5), 3.0 (c_6), 2.8 (c_7),$  y  $6.4 (c_8)$ . Debe mencionarse que incluso para los solutos pobremente muestreados, se encontró que los ocho parámetros eran significativos ( $CI_{rel} < 100\%$ ), aunque los intervalos de confianza para algunos parámetros ( $f$  y los coeficientes del término  $\log K$ ) fueron lógicamente mayores.

Según se ha indicado, en el caso de los compuestos básicos no se dispuso de suficiente información para estimar la retención de las especies básicas. Sin embargo, esto no perjudicó a las predicciones, ya que éstas se realizaron siempre dentro del dominio cubierto por el diseño experimental (especialmente en lo referente al pH). Nótese que para los compuestos básicos, una estimación inexacta de  $k_A$  no tiene consecuencias en las predicciones de  $k$ , porque la concentración de la especie básica es despreciable a los valores de pH más elevados del diseño, de modo que  $\delta_A \approx 0$  en la Ecuación (5.1), y  $k \approx \delta_{HA} k_{HA}$ .

Los compuestos seleccionados son representativos de la variedad de comportamientos que puede encontrarse entre los compuestos débilmente ionizables, que es el caso de la mayoría de fármacos. Se pueden establecer dos grandes grupos: los compuestos débilmente ácidos y los débilmente básicos (aminas). Puesto que en RPLC las especies retenidas son las neutras, los compuestos ácidos se retienen principalmente a valores de pH bajos (i.e. las especies básicas se encuentran cargadas negativamente y no se retienen), mientras que los compuestos amínicos se retienen principalmente a valores de pH elevados (i.e. las especies ácidas están cargadas positivamente y no se retienen).

De acuerdo con esto, el primer grupo de compuestos quedó bien muestreado por el diseño experimental, lo que incluye a furosemida y piretanida (mostradas en las Figuras 5.3 y 5.4), y bumetanida, probenecid y xipamida (no mostradas), con  $\log K = 4.5\text{--}5.5$  en agua, o estuvieron insuficientemente muestreadas, que es el caso de benzotiazida y triclorometiazida, con  $\log K > 5.5$ . Todos los compuestos básicos quedaron también pobremente muestreados: bendroflumetiazida y propranolol (mostrados), y clortalidona y

oxprenolol (no mostrados), con  $\log K > 9$ . Para algunas experiencias, el comportamiento ácido-base no fue evidente (e.g. bendroflumetiazida a 30°C).

Para el conjunto total de compuestos, el nivel de acidez máximo en el diseño ( $\text{pH} = 3$ ) fue suficientemente informativo para establecer la retención de las especies protonadas. Aunque la protonación de los compuestos más ácidos no fue completa para algunas combinaciones de niveles de acetonitrilo y temperatura, la falta de información en algunas regiones del dominio experimental se compensó por la proporcionada en otras regiones. Para los compuestos más débilmente ácidos y los básicos, la situación fue similar con relación a las formas básicas, que quedaron insuficientemente muestreadas a  $\text{pH} = 7$ . Una ampliación del dominio experimental en una unidad de  $\text{pH}$  (i.e. hasta  $\text{pH} = 8$ ) disminuiría el problema del inframuestreo hasta cierto punto, especialmente para los compuestos débilmente ácidos. Sin embargo, nuestra intención era afrontar los problemas asociados a una información incompleta, que es un riesgo potencial siempre presente cuando se consideran compuestos ionizables.

### ***5.5.3. Influencia del contenido de disolvente orgánico y de la temperatura sobre las constantes de protonación***

Como se ha explicado en la sección experimental, el electrodo de vidrio se calibró con tampones acuosos, pero la medida del  $\text{pH}$  en las fases móviles se llevó a cabo siempre tras la adición del disolvente orgánico. Por lo tanto, la escala de  $\text{pH}$  a la que van referidas todas las medidas es la  ${}^s_w\text{pH}$ . Para calcular de forma rigurosa las constantes de protonación en el medio hidro-orgánico de las fases móviles, los valores de  ${}^s_w\text{pH}$  deben corregirse de la siguiente forma:

$${}^s_s\text{pH} = {}^s_w\text{pH} - \delta \quad (5.15)$$

donde el término de corrección,  $\delta$ , considera el efecto primario del medio sobre el protón y la diferencia de los potenciales de unión líquida entre los dos disolventes. Este término depende principalmente del contenido de disolvente orgánico [16].



En la Ref. [16], los autores utilizaron distintos sistemas ácido-base para tamponar el pH a diferentes valores para disoluciones con diversos contenidos de disolventes orgánicos, y obtuvieron valores de  $\delta$  específicos para cada sistema regulador. Para obtener una expresión de corrección universal, propusieron promediar los valores de  $\delta$  asociados a un mismo porcentaje de disolvente orgánico. En nuestro caso, el pH se tamponó siempre con el sistema regulador del ácido cítrico. Utilizando los datos de la Ref. [16], se estableció la siguiente dependencia para los intervalos de acetonitrilo 0–60% en el intervalo de pH = 3–7, adoptando el mismo criterio de ajustar los valores de  $\delta$  promediados:

$$\delta(\varphi) = -0.3478\varphi^2 - 2.796\varphi^4 \quad (5.16)$$

Se ha publicado que el factor de corrección se mantiene prácticamente constante frente a la temperatura [9]. Por lo tanto, para transformar los valores de  $\log K$  de la escala  ${}_w\text{pH}$  a la escala  ${}_s\text{pH}$ , a una determinada temperatura, la única corrección que debe realizarse es:

$$\log {}_sK(\varphi, T) = \log {}_wK(\varphi, T) - \delta(\varphi) \quad (5.17)$$

La Tabla 5.2 muestra los valores de  $\log K$  corregidos a distintos contenidos de disolvente orgánico (en el intervalo 0–50%) y temperatura (20–50°C), para los compuestos muestreados aceptablemente (i.e. para los que la curva de protonación completa pudo monitorizarse al menos en una de las combinaciones de  $\varphi$  y  $T$ ) en el dominio del diseño experimental (el intervalo de  $\log K$  se indica entre paréntesis): bumetanida (3.8–5.5), furosemida (4.3–5.9), piretanida (3.7–5.4), probenecid (3.4–6.1), y xipamida (4.8–5.7). Como se ha comentado, el dominio de acetonitrilo cubierto por el diseño estaba comprendido entre el 25 y el 45%, por lo que los valores de  $\log K$  calculados a 0, 10 y 50% son extrapolaciones, y deben ser analizados con precaución. Con todo, puede observarse que se encontró una excelente concordancia entre los valores de  $\log K$  en agua (ver Tabla 5.1), y los obtenidos por extrapolación a 0% de acetonitrilo a partir de nuestros resultados.

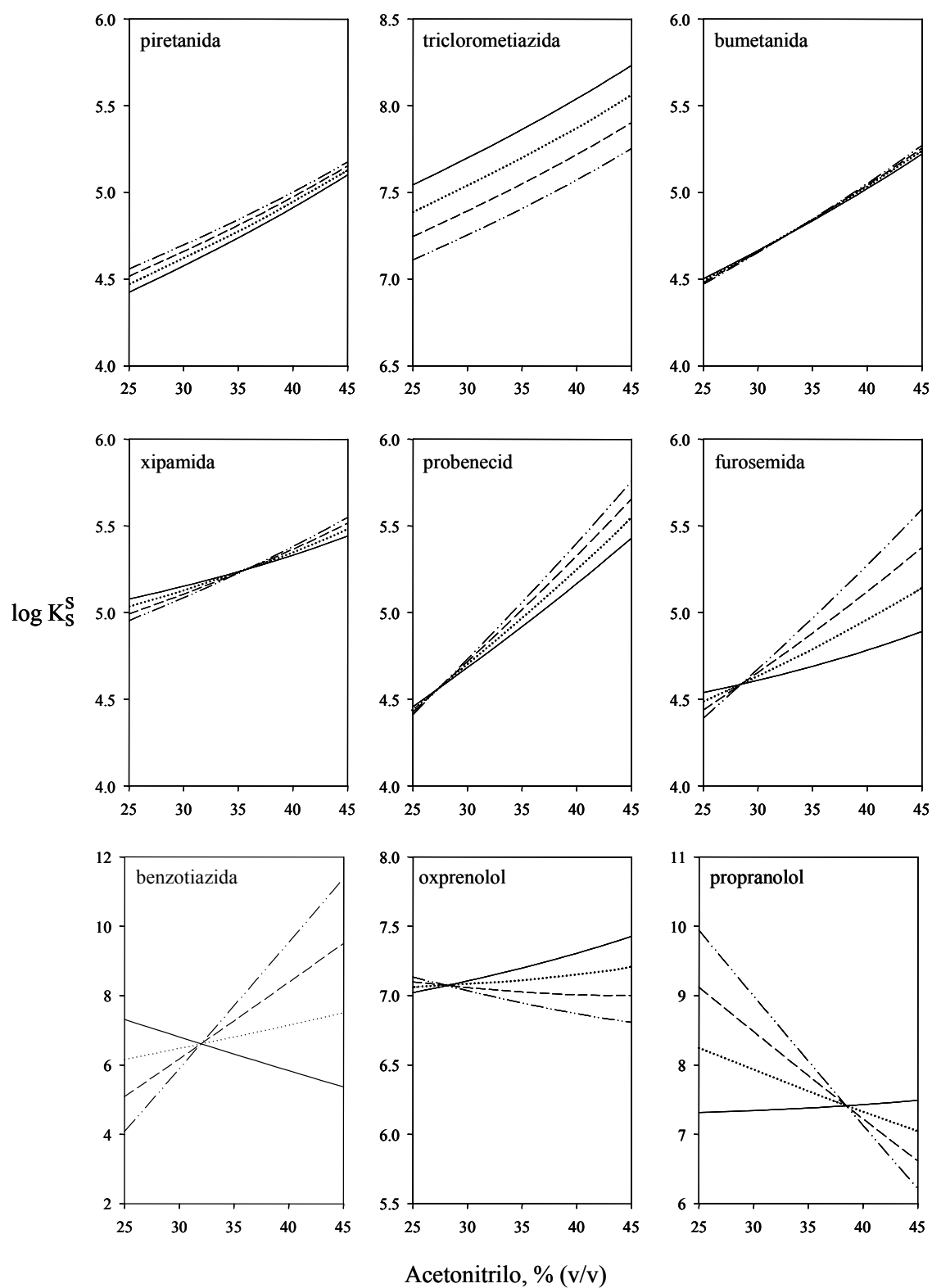
**Tabla 5.2.** Constantes de protonación predichas de acuerdo a la Ecuación (5.13), a diversos valores de contenido de disolvente orgánico y temperatura.

Compuesto	Temperatura (°C)	Acetonitrilo (v/v, %)					
		0	10	20	30	40	50
Bumetanida	20	3.8	4.0	4.3	4.7	5.0	5.4
	30	3.7	4.0	4.3	4.7	5.0	5.5
	40	3.7	4.0	4.3	4.7	5.0	5.5
	50	3.6	4.0	4.3	4.7	5.1	5.5
Furosemida	20	4.3	4.4	4.5	4.6	4.8	5.0
	30	3.8	4.1	4.3	4.6	5.0	5.3
	40	3.4	3.8	4.2	4.7	5.1	5.6
	50	3.0	3.6	4.1	4.7	5.3	5.9
Piretanida	20	3.7	4.0	4.3	4.6	4.9	5.3
	30	3.8	4.1	4.3	4.6	4.9	5.3
	40	3.9	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3
	50	3.9	4.2	4.4	4.7	5.0	5.4
Probenecid	20	3.4	3.8	4.2	4.7	5.2	5.7
	30	3.2	3.7	4.2	4.7	5.2	5.9
	40	3.0	3.6	4.1	4.7	5.3	6.0
	50	2.9	3.5	4.1	4.7	5.4	6.1
Xipamida	20	4.8	4.9	5.0	5.2	5.3	5.6
	30	4.6	4.8	4.9	5.1	5.3	5.6
	40	4.5	4.7	4.9	5.1	5.4	5.7
	50	4.4	4.6	4.8	5.1	5.4	5.7

La Figura 5.5 muestra gráficamente las variaciones en los valores de  $\log K$  predichos por el modelo. No se ha incluido clortalidona y bendroflumetiazida en esta figura, debido a la insuficiencia de información proporcionada por el diseño. Pueden observarse diversas pautas de variación, que son ligeramente no lineales. De las gráficas se concluye que el contenido de disolvente orgánico tiene un efecto sobre el comportamiento ácido-base mayor que la temperatura (al menos en los intervalos estudiados: 25–45% de acetonitrilo y 20–50°C), y generalmente da lugar a incrementos en  $\log K$ . La temperatura produce efectos mucho más variables. La variación de  $\log K$  con la temperatura es escasa para piretanida, bumetanida y xipamida, y sistemáticamente creciente para piretanida y triclorometiazida. La benzotiazida y el propranolol sufren cambios muy intensos.

La coincidencia de todas las líneas observadas para algunos compuestos a un mismo contenido de disolvente orgánico es una consecuencia directa del tipo de variación que se ha impuesto al término de  $\log K$  en el modelo propuesto, que incluye efectos primarios para los factores principales (i.e. una dependencia lineal con  $\phi$  y  $1/T$ ) y un término de interacción lineal entre ambos factores (i.e.  $\phi/T$ ). La introducción de dependencias más complejas en el término de  $\log K$  cabría esperar que proporcionara alteraciones en los puntos de cruce, pero se requeriría un diseño experimental aún más complejo.

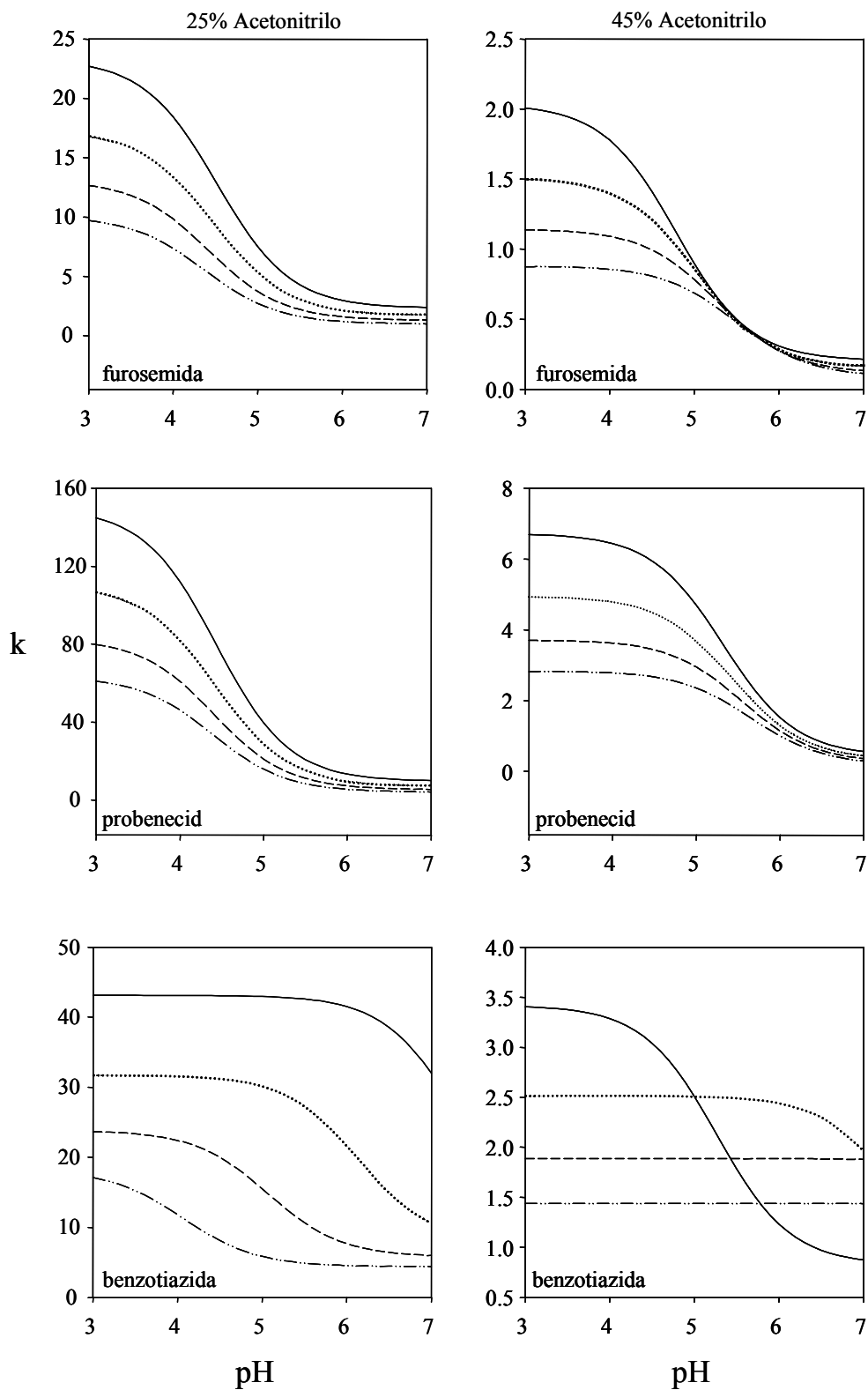
Resulta interesante señalar que para benzotiazida, oxprenolol y propranolol, el signo de la pendiente de las gráficas de  $\log K$  versus  $\phi$  depende de la temperatura. Esto significa que existe una temperatura a la cual la dependencia es nula: ca. 25, 35 y 25°C para benzotiazida, oxprenolol y propranolol, respectivamente. Además, triclorometiazida y oxprenolol exhiben un comportamiento peculiar, ya que la temperatura induce un efecto opuesto al producido en los otros compuestos. Así, por ejemplo, a un 45% de acetonitrilo, estos dos compuestos parecen ser menos ácidos a temperatura más elevada, mientras que los otros compuestos tienden a hacerse más ácidos. Sin embargo, este resultado debe tomarse con precaución, puesto que la región de caída de la retención para estos compuestos queda pobremente muestreada por el diseño experimental, como se muestra más abajo.



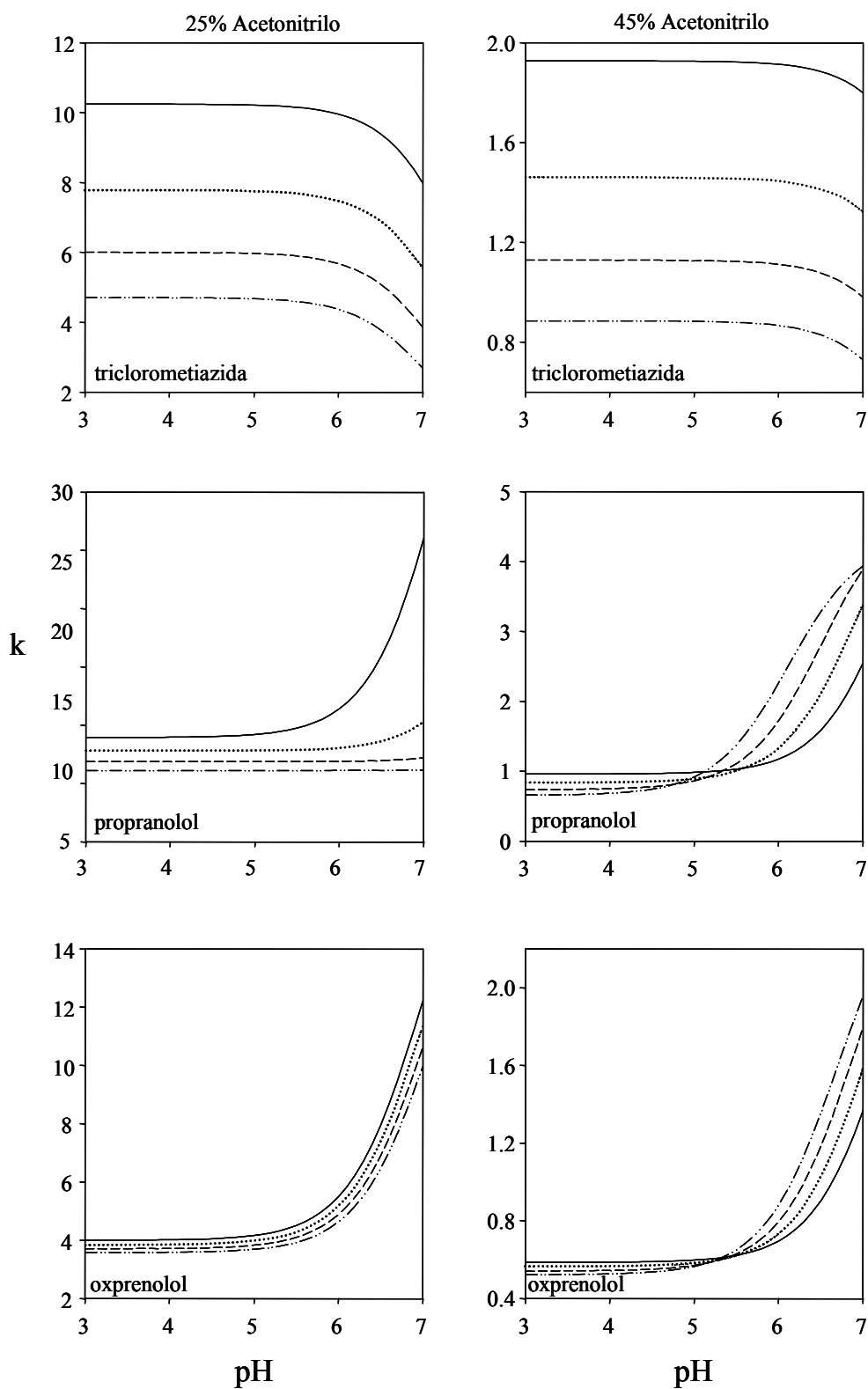
**Figura 5.5.** Influencia del contenido de disolvente orgánico sobre la constante de protonación ( $\log {}^sK$ ) a cuatro niveles de temperatura: 20°C (línea continua), 30°C (línea punteada), 40°C (línea a trazos), y 50°C (línea punto-punto-trazo).

Los efectos comentados anteriormente, referidos a la influencia del contenido de disolvente orgánico y de la temperatura sobre el proceso de protonación, se traducen en desplazamientos de las curvas de retención respecto al pH. Las Figuras 5.6 y 5.7 muestran estos desplazamientos a los dos niveles extremos de contenido de disolvente orgánico (25 y 45% de acetonitrilo) y cuatro niveles de temperatura (20, 30, 40 y 50°C). La situación más destacable en relación a los desplazamientos en el comportamiento ácido-base se observa para la benzotiazida, que se ve fuertemente afectada tanto por el cambio en el contenido de disolvente orgánico como por la temperatura. Para este compuesto, la magnitud de los desplazamientos llega a alcanzar varias unidades de  $\log K$ , lo que significa que en algunas condiciones de  $\varphi$  y  $T$  se llega a observar la totalidad del proceso de protonación, mientras que en otras no se observa un comportamiento ácido-base aparente. Por otro lado, a temperatura elevada y alto contenido de acetonitrilo, la protonación del propranolol a pH 7 es casi completa, mientras que esto no sucede bajo ninguna condición de  $\varphi$  y  $T$  para el oxprenolol.

Debe notarse que los desplazamientos producidos por los cambios en la escala de pH (de  $^s_w\text{pH}$  a  $^s_s\text{pH}$ ) no tienen consecuencias ni en el ajuste de los modelos, ni en las predicciones, siempre que se utilice la misma escala de pH en todas las operaciones.



**Figura 5.6.** Factor de retención versus pH para furosemida, probenecid y benzotiazida a 25% y 45% de acetonitrilo, y cuatro niveles de temperatura: 20°C (línea continua), 30°C (línea punteada), 40°C (línea a trazos), y 50°C (línea punto-punto-trazo).



**Figura 5.7.** Factor de retención versus pH para triclorometiazida, propranolol y oxprenolol a 25% y 45% de acetonitrilo, y cuatro niveles de temperatura: 20°C (línea continua), 30°C (línea punteada), 40°C (línea a trazos), y 50°C (línea punto-punto-trazo).

#### **5.5.4. Consideraciones sobre la eficacia, la fuerza eluyente y la selectividad**

##### **a) Eficacia**

No es fácil generalizar la influencia de los factores estudiados sobre la anchura de los picos cromatográficos, ya que depende excesivamente de la naturaleza de los solutos. Con el fin de obtener estimaciones generales asociadas a cada condición experimental, optamos por usar la definición de eficacia gaussiana medida al 10% de la altura del pico:

$$N = 18.4 \frac{t_R^2}{w^2} \quad (5.18)$$

Así, para cada condición experimental, se estableció una correlación entre la anchura del pico correspondiente ( $w$ ) y el tiempo de retención de cada soluto ( $t_R$ ), que proporcionó un valor de  $N$  asociado a la columna empleada. La Tabla 5.3 muestra los valores de  $N$  para diferentes condiciones experimentales, así como los coeficientes de correlación de las regresiones. Para poder evaluar la influencia del contenido de disolvente orgánico, de la temperatura y del pH sobre  $N$ , queda todavía por resolver el problema de las diferencias de escala de cada variable. Este problema se solucionó ajustando los valores de  $N$  para los puntos extremos del diseño, respecto a las variables normalizadas en el intervalo  $[-1, +1]$ . De este modo se obtuvo la siguiente dependencia, considerando todos los compuestos simultáneamente:

$$N = 14220 + 2510T + 3740\phi - 6070\text{pH} + 2440T\phi - 230T\text{pH} - 2110\phi\text{pH} \quad (5.19)$$

Se observa que el factor más influyente sobre la eficacia es el pH (con un efecto perjudicial sobre  $N$ ), seguido por el contenido de disolvente orgánico y la temperatura (ambos beneficiosos). Los términos de interacción son importantes, excepto en el caso de la combinación temperatura/pH. Un mayor contenido de acetonitrilo tiende a hacer a la fase móvil más parecida en polaridad a la fase estacionaria (más hidrofóbica) y a disminuir su viscosidad, de la misma forma que ocurre operando a temperaturas más elevadas. Así, en ambos casos, se puede concluir que la eficacia debe aumentar. El comportamiento es demasiado variable como para que sea posible un estudio por separado de los compuestos ácidos y básicos. Sin embargo, si examinamos los valores individuales de  $N$ , se puede concluir que la eficacia se incrementa con el pH para los compuestos básicos y disminuye para los ácidos.



**Tabla 3.** Eficacias gaussianas calculadas a partir de la correlación entre las anchuras y los tiempos de retención y anchuras para el conjunto completo de compuestos de prueba.

Acetonitrilo (v/v, %)	Temperatura (°C)	pH	N	R	Acetonitrilo (v/v, %)	Temperatura (°C)	pH	N	R
25	20	7.14	5820	0.9955	35	40	5.42	29410	0.9879
	30	5.11	14385	0.9992		50	5.42	30390	0.9883
	50	7.29	9890	0.9907		30	5.40	25765	0.9821
30	30	3.22	13480	0.9996	45	20	3.38	20100	0.9970
	30	5.20	16480	0.9976		20	7.35	5930	0.9606
	45	5.20	20170	0.9969		30	5.54	32490	0.9564
	25	5.42	16305	0.9572		50	3.42	32190	0.9923
	30	3.63	15680	0.9991		50	7.28	13645	0.9985
	30	4.10	17180	0.9992					
	30	5.42	23740	0.9830					
	30	6.08	24500	0.8689					
30	30	7.47	6680	0.9825	30				
	30	7.25	6605	0.9761					

**b) Fuerza eluyente**

El concepto de fuerza eluyente surge del establecimiento de relaciones lineales entre una transformación de  $k$  (e.g.  $\log k$  o  $1/k$ ), y los factores experimentales. Así, la relación entre retención y el contenido de disolvente orgánico puede escribirse de la siguiente forma (véase también la Ecuación (5.9)):

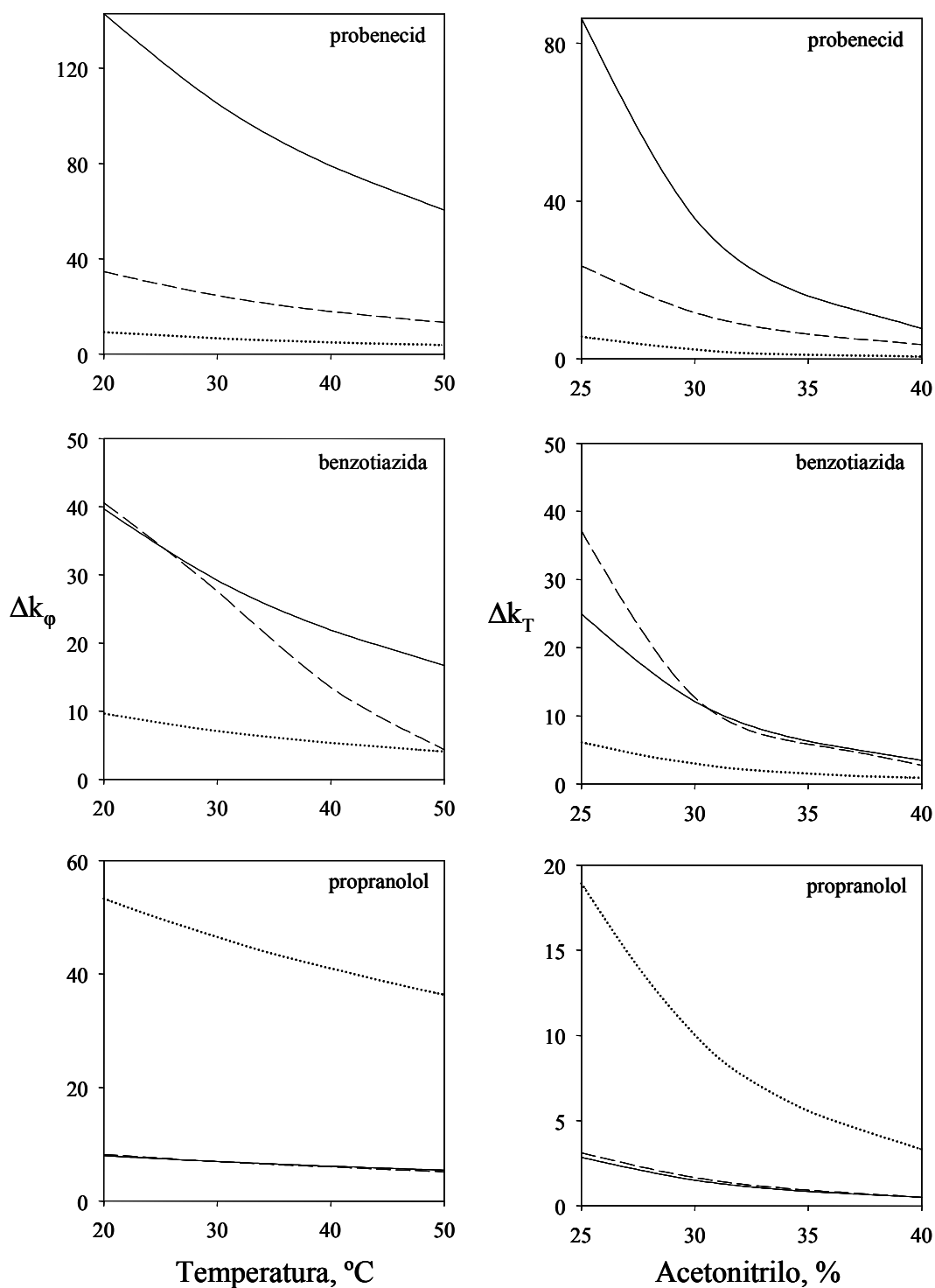
$$\log k = c_0 - S_\phi \phi \quad (5.20)$$

siendo  $S_\phi$  la fuerza eluyente del disolvente orgánico. En el caso de la temperatura (Ecuación (5.5)):

$$\log k = c_0 + \frac{1}{S_T T} \quad (5.21)$$

Tanto  $S_\phi$  como  $S_T$  son cantidades positivas e indican que los incrementos en el contenido de disolvente orgánico y en la temperatura dan lugar a disminuciones en la retención. Así, estos parámetros pueden ser considerados como medidas de la fuerza eluyente de los solutos, aunque no pueden compararse entre sí debido a la diferente funcionalidad y escala. A pesar de ello, deseábamos comparar, aunque fuera de forma aproximada, la fuerza del disolvente orgánico y de la temperatura. Con este fin, calculamos la retención a tres niveles de pH (0, 5, y 14). Debido al comportamiento débilmente ácido y básico de los compuestos de prueba, se puede considerar que la retención en los extremos de pH corresponde a  $k_{HA}$  y  $k_A$ , respectivamente (aunque la estimación de  $k_A$  es bastante incierta para los dos compuestos básicos).

A continuación, se calculó la diferencia entre los datos de retención para los valores extremos de contenido de disolvente orgánico en el dominio experimental (i.e. 25 y 45% de acetonitrilo), a distintas temperaturas. Se siguió un proceso similar con la temperatura, calculando en este caso la diferencia entre los valores de retención a 20 y 50°C a diferentes contenidos de disolvente orgánico. Algunos resultados se muestran en la Figura 5.8.



**Figura 5.8.** Efecto de la fuerza del disolvente orgánico y de la temperatura sobre la retención.  $\Delta k_\phi$  es la diferencia entre 25 y 45% de acetonitrilo, y  $\Delta k_T$  es la diferencia entre 20 y 50°C: pH = 0 ( $k = k_{HA}$ , línea continua), pH = 5 (línea punteada), pH = 14 ( $k = k_A$ , línea a trazos). Para propranolol (compuestos básicos),  $k = k_{HA}$  a pH = 5.

Como se observa, la fuerza del disolvente orgánico es siempre apreciablemente mayor que la de la temperatura, al menos en el dominio experimental estudiado. Los solutos restantes (no dibujados) se comportaron de manera similar al probenecid. El comportamiento particular de la benzotiazida se explica atendiendo a los fuertes desplazamientos que se producen en la constante de acidez con el contenido de disolvente orgánico y la temperatura, que puede observarse en las Figuras 5.5 y 5.6.

Nótese que el concepto de fuerza eluyente no puede aplicarse al pH, porque no es posible establecer una relación lineal entre una transformación de  $k$  y el pH (Ecuación (5.1)), excepto en dominios estrechos, lo que no posee interés práctico. En otras palabras, no existe un valor único de fuerza eluyente, puesto que ésta depende de la distancia entre el pH y  $\log K$ , además de los valores de  $k_{HA}$  y  $k_A$ .

### **c) Selectividad**

La Tabla 5.4 muestra los factores de retención para las especies ácidas ( $k_{HA}$ ) y básicas ( $k_A$ ) a diferentes contenidos de disolvente orgánico y temperatura, dentro del dominio experimental. Como puede observarse, los cambios en la retención entre las condiciones de máxima y mínima fuerza eluyente (45% de acetonitrilo/50°C y 25% de acetonitrilo/20°C, respectivamente) pueden ser extremadamente grandes. Además, la gran diferencia entre los valores de  $k_{HA}$  y  $k_A$ , especialmente para condiciones eluyentes débiles y compuestos de polaridad baja, implica grandes saltos en la retención. Si consideramos que estos saltos ocupan aproximadamente dos unidades de pH, y que la fuerza eluyente asociada al pH es apreciablemente mayor para el compuesto que experimenta una reacción ácido-base, se comprende con facilidad las dificultades que se encuentran en el uso del pH como un factor de separación activo, ya que la predicción de la retención puede llegar a ser extremadamente crítica.

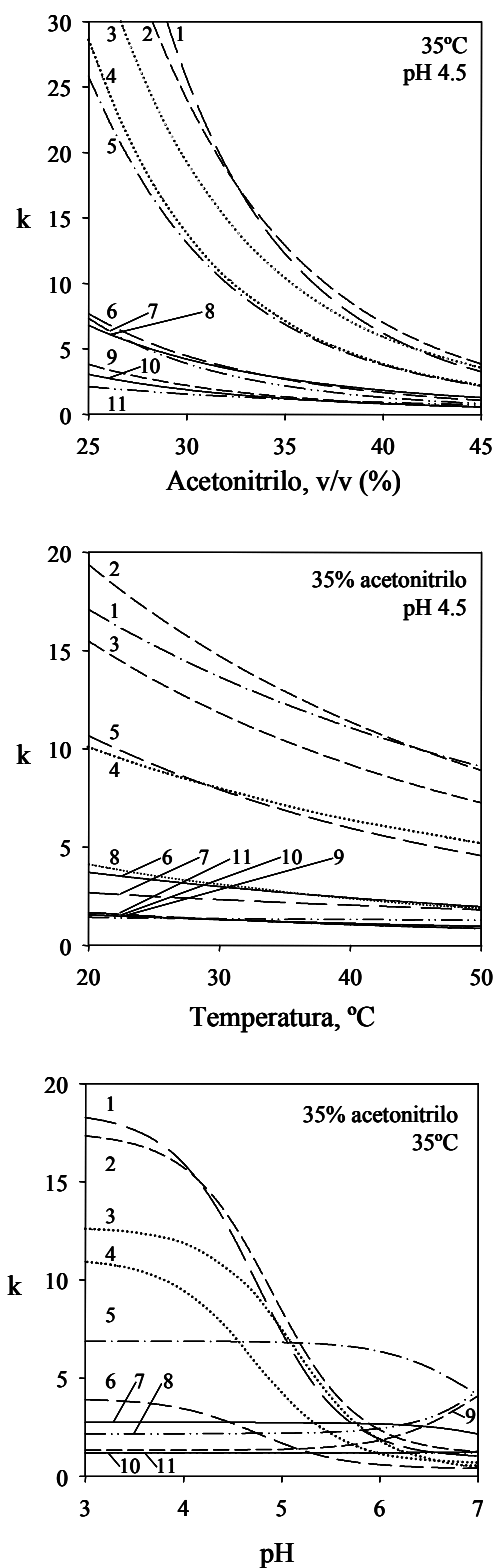
**Tabla 5.4.** Factores de retención para las especies ácidas ( $k_{HA}$ ) y básicas ( $k_A$ ) de algunos compuestos de prueba.

Compuesto		Acetonitrilo (v/v, %) / Temperatura (°C)									
		25/20	25/30	25/40	25/50	35/20	35/50	45/20	45/30	45/40	45/50
Benzotiazida	$k_{HA}$	43.1	31.7	23.8	18.2	10.8	4.56	3.42	2.51	1.89	1.44
	$k_A$	10.5	7.70	5.78	4.41	2.62	1.11	0.83	0.61	0.46	0.35
Bumetanida	$k_{HA}$	160.0	127.3	103.0	84.4	25.9	13.7	5.70	4.55	3.86	3.01
	$k_A$	8.06	6.43	5.20	4.26	1.31	0.69	0.29	0.23	0.19	0.15
Furosemda	$k_{HA}$	23.3	17.3	13.1	10.1	6.17	2.66	2.04	1.51	1.14	0.88
	$k_A$	2.32	1.72	1.30	1.00	0.61	0.26	0.20	0.15	0.11	0.09
Piretanida	$k_{HA}$	83.4	63.9	49.8	39.4	16.5	7.79	4.28	3.28	2.55	2.02
	$k_A$	5.15	3.94	3.07	2.43	1.02	0.48	0.26	0.20	0.16	0.12
Probenecid	$k_{HA}$	149.6	110.2	82.7	63.2	27.5	11.6	6.72	4.95	3.72	2.84
	$k_A$	9.62	7.08	5.32	4.06	1.77	0.75	0.43	0.32	0.24	0.18
Propranolol	$k_{HA}$	8.94	7.81	6.88	6.10	2.65	1.81	0.96	0.84	0.74	0.65
	$k_A$	59.6	52.0	45.8	40.7	17.6	12.0	6.40	5.59	4.92	4.37
Xipamida	$k_{HA}$	73.9	56.5	44.0	34.7	18.84	8.85	6.04	4.62	3.59	2.84
	$k_A$	1.80	1.38	1.07	0.85	0.46	0.22	0.15	0.11	0.09	0.07

La Figura 5.9 muestra los cambios en la retención que se esperan siguiendo la dirección de cada uno de los factores experimentales. Como los efectos no son exactamente iguales para todos los compuestos, las pautas de retención no son paralelas, y en consecuencia, se producen cambios en el orden de elución a unas determinadas condiciones experimentales. El efecto diferencial es pequeño para la temperatura, moderado para el contenido de disolvente orgánico y muy intenso para el pH. Éste es el orden de importancia de estos tres factores respecto a la selectividad. Debe tenerse también en cuenta que el efecto del disolvente orgánico y de la temperatura se magnifican debido a la interacción con el pH, ya que el contenido de disolvente orgánico y la temperatura afectan el comportamiento ácido-base.

A tenor de estos resultados, podríamos concluir que el pH es el factor más interesante para alterar la selectividad. Sin embargo, presenta dos desventajas. La primera es que para un determinado compuesto, la región de mayor impacto en la selectividad (i.e. la región donde la fuerza eluyente es mayor) se circunscribe al intervalo de pH que corresponde al salto, que es distinta para cada soluto. En segundo lugar, la magnitud de las caídas puede hacer que el control del pH resulte demasiado crítico. Una disminución en el contenido de disolvente orgánico y en la temperatura incrementa la altura de los saltos de retención con el pH, mientras que su anchura (i.e. en la dirección del pH) se mantiene (ca. dos unidades de pH).

En consecuencia, las regiones con fuerza eluyente demasiado baja asociadas a contenidos bajos de disolvente orgánico y/o temperatura, son demasiado inseguras desde un punto de vista práctico, debido a que dan lugar a grandes cambios en la retención. A ello debe añadirse la imprecisión usual en la medida del pH. La fuerza eluyente puede ser tan grande que no permita su control adecuado. Así, el uso del pH como factor activo es más adecuado a contenidos de disolvente orgánico y/o temperaturas moderados o altos, lo que favorece además la obtención de tiempos de análisis más apropiados.



**Figura 5.9.** Retención para el conjunto completo de solutos de prueba en función de cada factor. Compuestos: (1) bumetanida, (2) probenecid, (3) xipamida, (4) piretanida, (5) benzotiazida, (6) furosemida, (7) propranolol, (8) triclorometiazida, (9) oxprenolol, (10) clortalidona, y (11) bendroflumetiazida.

## 5.6. Conclusiones

El problema abordado en este capítulo es complejo en más de un sentido. El mismo diseño experimental debe satisfacer los requisitos de información para solutos que exhiben distinto comportamiento ácido-base. Esto significa que en algunos casos los solutos quedan bien muestreados por el diseño, mientras que en otros no existirá información suficiente para permitir un ajuste adecuado. De los tres factores considerados, el pH es particularmente problemático, debido a las caídas súbitas en la retención. En consecuencia, el número de datos experimentales necesarios para ajustar los modelos de retención puede ser bastante mayor que el esperado considerando únicamente el número de coeficientes. Por otro lado, la inclusión simultánea de tres factores con interacciones mutuas significativas hace inadecuado el uso de ecuaciones empíricas.

La Ecuación (5.13) es sólo válida para analitos monopróticos. Aparentemente, los compuestos polipróticos quedarían fuera de este estudio. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en muchos casos, las protonaciones secundarias no se manifiestan en la ventana de pH de trabajo (en nuestro caso, entre 3 y 7), debido a la distancia entre los valores de  $\log K$  sucesivos. De hecho, algunos de los compuestos de prueba considerados en este estudio son polipróticos (bumetanida, furosemida, xipamida y triclorometiazida), y como se puede concluir a partir de los gráficos de correlación, no ha sido necesario considerar un subsiguiente equilibrio ácido-base.

Una segunda simplificación concierne a la relación matemática que describe la dependencia de  $\log K$  versus  $\varphi$  y  $T$ . La dispersión observada en los gráficos de correlación a retenciones bajas parece indicar la necesidad de una dependencia más compleja. Se comprobó, sin embargo, que expresiones que incluían términos cuadráticos adicionales,  $c_9\varphi^2$  o  $c_9T^{-2}$  no producían mejoras significativas.

En el caso de los solutos ionizables, los tres factores estudiados permiten gobernar la selectividad y la retención. La temperatura tiene una influencia en algunos casos comparable a la del contenido de disolvente orgánico. Los resultados sugieren el interés de extender el intervalo de temperaturas a valores superiores para ampliar los efectos beneficiosos de este factor. Sin embargo, ello requeriría una instrumentación especial.



El estudio aquí presentado se enfoca al desarrollo y validación de un modelo de retención complejo. Para asegurar una correcta inferencia del comportamiento del sistema se hizo uso de un diseño experimental exhaustivo, que incluía los datos de retención obtenidos con 34 fases móviles. Evidentemente, un diseño de este tipo es inviable en el trabajo de rutina, cuando el propósito es desarrollar nuevos métodos de separación. Un objetivo futuro es reducir el esfuerzo experimental tanto como sea posible, a fin de conseguir que la optimización simultánea de los tres factores sea práctica.

## 5.7. Referencias

1. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 125.
2. R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 157.
3. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 47.
4. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 51.
5. J.W. Dolan, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 195.
6. J. Li, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 69 (1997) 837.
7. C.B. Castells, L.G. Gagliardi, C. Rafols, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 23.
8. L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 159.
9. L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5858.
10. R.C. Chloupek, W.S. Hancock, B.A. Marchylo, J.J. Kirkland, B.E. Boyes, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 45.
11. J. Li, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 21.
12. J.W. Dolan, L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, T.J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 21.
13. R.G. Wolcott, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 3.
14. J.W. Dolan, L.R. Snyder, T. Blanc, L. van Heukelem, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 37.

15. D. Guillarme, S. Heinisch, J.L. Rocca, J. Chromatogr. A 1052 (2004) 39.
16. S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 72 (2000) 5193.
17. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 955 (2002) 19.
18. C.C. Hansch, in Comprehensive Medicinal Chemistry (R.G. Sammes y J.B. Taylor, Eds.), Pergamon Press, Oxford, 1990, Vol. 6.
19. R. Ventura, J. Segura, J. Chromatogr. B 687 (1996) 127.
20. A. Berthod, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chem. 71 (1999) 879.
21. W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery, Numerical Recipes in C++: the Art of Scientific Computing, 2nd edition, Cambridge University Press, New York, 1992.

## Capítulo 6

### **Efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura sobre el comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables: Beneficios de la optimización simultánea**

#### **6.1. Resumen**

Se muestra la aplicación del modelo mecanicista de ocho parámetros expuesto en el Capítulo 5 a la optimización de la separación de 11 compuestos ionizables (nueve diuréticos y dos  $\beta$ -bloqueantes), considerando el contenido de disolvente orgánico, pH y la temperatura como factores experimentales. Para modelizar la retención, se hizo uso de los datos adquiridos en 23 experiencias, ordenadas de acuerdo a un diseño central compuesto. Se utilizaron modelos locales para predecir la eficacia y la asimetría de pico. La estrategia de optimización, basada en el uso de la pureza de pico como función cromatográfica objetivo, fue capaz de encontrar las condiciones experimentales más adecuadas para conseguir la resolución completa en tiempos de análisis razonables. También permitió una inspección detallada de la capacidad separadora de los factores estudiados, y de las consecuencias de los desplazamientos en las constantes de protonación, originados por cambios en el contenido de disolvente orgánico y en la temperatura. El tamaño de las estructuras de resolución sugirió que el orden de importancia de los factores es: pH, disolvente orgánico y temperatura, con dominios de resolución completa relativamente estrechos. Se encontró, sin embargo, que los tres factores son valiosos en la optimización de la selectividad. Se verificaron experimentalmente las condiciones óptimas predichas correspondientes a dos regiones de resolución óptima. A pesar de las dificultades asociadas al uso del pH como factor de optimización, la concordancia fue satisfactoria en ambas regiones.

## 6.2. Introducción

El éxito de una separación cromatográfica radica en conseguir la interacción diferencial de los componentes de la mezcla analizada con la columna, lo que se lleva a cabo modificando cuidadosamente las variables medio-ambientales que muestran un mayor impacto sobre la selectividad. Con el fin de optimizar la selectividad, se utilizan convencionalmente estrategias de prueba y error basadas en la experiencia del cromatografista. Desafortunadamente, la aplicación de estas estrategias requiere mucho tiempo y suelen fracasar con muestras que contienen un gran número de compuestos, o cuando existen múltiples variables involucradas con efectos difíciles de predecir. La situación empeora cuando el poder de resolución en el orden cromatográfico es insuficiente y no puede completarse con la riqueza de la señal proporcionada por el detector o mediante una segunda separación. No es sorprendente el interés por desarrollar métodos capaces de encontrar las condiciones de separación óptimas de manera sistemática.

Los factores generalmente seleccionados para gobernar la separación y el tiempo de análisis en cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) son el pH, la temperatura, el flujo, y las concentraciones de uno o más disolventes orgánicos, tampones, sales, modificadores amínicos, tensioactivos o reactivos formadores de pares iónicos. Sin embargo, el esfuerzo experimental necesario para alcanzar la mejor separación crece exponencialmente con el número de factores. De ahí que el cromatografista se centre en los factores más relevantes, generalmente uno o dos. En las situaciones más simples, los problemas se pueden resolver como casos de un único factor, restringiendo los intervalos experimentales, de forma que las interacciones con otro factor se hagan despreciables y las propiedades cromatográficas varíen linealmente [1]. Sin embargo, la reducción del número de factores o de sus intervalos también disminuye la probabilidad de éxito de la separación, particularmente en situaciones donde dominan más de dos factores, y existen fuertes interacciones entre ellos.

Las Tablas 6.1 y 6.2 muestran métodos publicados que tratan problemas de separación donde la optimización final concierne a tres o más factores. La Tabla 6.1 considera optimizaciones donde la temperatura no es un factor activo, y la Tabla 6.2 se

refiere a casos donde la temperatura se utiliza también para gobernar la separación. Como se puede observar, las herramientas aplicadas son las clásicas en problemas de optimización en otros campos.

La mayoría de los planteamientos indicados en las Tablas 6.1 y 6.2 implican el desarrollo de un método sistemático a través de un diseño experimental. Sólo en unos pocos casos se han aplicado métodos de búsqueda directa, como la optimización simplex [20,22,28]. Sin embargo, ésta no es muy adecuada en problemas cromatográficos, debido a la naturaleza multi-modal de las superficies de resolución (debido al cambio del orden de elución de los picos) y a la necesidad de satisfacer uno o más objetivos simultáneamente (e.g. resolución máxima, y tiempo y coste mínimos). Los métodos basados en diseños experimentales prevalecen en la bibliografía. Idealmente, un procedimiento de optimización incluye dos etapas: la llamada etapa de exploración (*screening*), y la optimización propiamente dicha. En la etapa de exploración, se estudia el impacto de cada factor y las interacciones entre ellos, con el fin de ordenarlos en importancia, encontrar los niveles más favorables y fijar los factores menos influyentes. En la etapa de optimización, los factores más relevantes se refinan con diseños experimentales más exhaustivos. El trabajo aquí presentado se refiere a la etapa de optimización.

Los diseños más frecuentes utilizados en problemas de optimización que implican tres o más factores son los diseños de mezcla [4,10], los centrales compuestos [2,11,13,21], los D-óptimos [23], y algunos otros, como los de Hoke [19]. Los diseños de mezcla implican variables interdependientes, tal como el contenido de dos o más disolventes, y poseen la ventaja de ser económicos respecto al número de experiencias. Los diseños centrales compuestos son los más adecuados para detectar curvaturas en un espacio multi-dimensional, pero requieren un gran número de experiencias si se consideran más de dos factores. Los diseños D-óptimos son menos frecuentes, pero resultan sólo adecuados en los casos que implican funciones lineales donde los factores pueden modificarse en una región restringida, creando así un dominio experimental irregular en el que no se logra la ortogonalidad. Los diseños de Hoke son útiles siempre que los resultados experimentales queden dentro del dominio del factor, pero excepto en estas situaciones, no presentan ventajas relevantes sobre los diseños centrales compuestos.

**Tabla 6.1.** Revisión bibliográfica de separaciones cromatográficas multifactor en RPLC, donde la temperatura no es un objetivo en la optimización.

Factores optimizados	Herramientas matemáticas	Solutos	Ref.
Fase móvil ternaria: Relación acetonitrilo/metanol, tampón (fosfato) y flujo	Diseño central compuesto, modelización de superficie de respuesta y decisión multicriterio	Domperidona y pantoprazol	2
Fase móvil ternaria: Acetonitrilo, metanol y tampón (acetato) de pH 4.2	Interpolación de esplines cúbicos utilizando dos fases binarias iseluotrópicas (acetonitrilo/tampón y metanol/tampón)	7 antioxidantes fenólicos	3
Fase móvil cuaternaria: Acetonitrilo, metanol, tetrahydrofurano y pH 4.7, solución tampón (heptanosulfonato / $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / ácido cítrico / trietilamina)	Software de optimización de disolvente (Unicam) para optimizar la composición dentro de un plano eluotrópico	Nicotina y 5 metabolitos, y cafeína	4
pH, acetonitrilo y metanol	Diseño factorial fraccional (matriz ortogonal)	20 pesticidas	5
pH, metanol y tampón (acetato)	Diagrama de ventana, optimizando sólo el pH y la relación metanol/tampón	Amilorida e hidroclorotiazida Metildopa, amilorida e hidroclorotiazida	6 7
pH, metanol y tampón (fosfato)	Diseño experimental y redes neuronales	Monofosfato de deoxicitidina y monofosfato de metildeoxicitidina	8
pH, metanol y metilamina	Diseño factorial, modelización de superficies de respuesta y diagramas de ventanas	Clorpromazina y 13 metabolitos	9

Tabla 6.1. (continuación).

Factores optimizados	Herramientas matemáticas	Solutos	Ref.
pH, metanol y octanosulfonato / citrato	Gráfico de mínima resolución basado en un diseño de mezclas de metanol y dos tampones a distinto valor de pH	Dos mezclas de 4 vitaminas solubles y 4 anestésicos locales	10
pH, acetonitrilo (gradiente) e hidrógenosulfato de tetrabutilamonio	Diseño experimental compuesto (centrado en las caras)	Eritromicina A y 7 compuestos relacionados	11
pH, acetonitrilo, cadena alquílica y concentración de reactivos de interacción iónica (varias alquilaminas)	Diseño factorial fraccional y de estrella utilizando la transformación de Box-Cox	21 sulfonatos aromáticos	12
pH, tetrabutilamonio y una sal ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (cromatografía de pares iónicos)	Diseño central compuesto, modelización de superficie de respuesta y trazado de funciones iso-respuesta	Monometilarsonato y dimetilarsonato o selenometionina y selenito	13
Fase móvil cuaternaria: pH, acetonitrilo, heptanosulfonato sódico y tampón (acetato)	Diagramas de ventana para mezclas de dos disoluciones	Catecolaminas	14
pH, dodecilsulfato, propanol (cromatografía líquida micelar)	Modelización de superficies de respuesta utilizando modelos mecanicistas	4 diuréticos, tirosina, sulfanilamida y benzocaína 15 diuréticos	15 16
pH, metanol y flujo	Diseño factorial y modelización de superficies de respuesta	Ocratoxina A	17
pH, acetonitrilo y octilsulfato	Diseños fraccional y factorial completo para la exploración y modelización del tiempo de retención	17 neurotransmisores monoamina	18
pH, acetonitrilo, concentración y longitud de cadena de agentes formadores de pares iónicos (sales de alquilamonio) y flujo (cromatografía de interacción iónica)	Diseños fraccional y de Hoke, y redes neuronales	5 pesticidas	19

**Tabla 2.** Revisión bibliográfica de separaciones cromatográficas multifactor en RPLC, incluyendo la temperatura como factor.

Factores optimizados	Herramientas matemáticas	Solutos	Ref.
Temperatura, pendiente del gradiente y flujo	Simplex	5 esteroides	20
Temperatura, acetonitrilo y flujo	Diseño central compuesto y búsqueda taboo	7 ésteres <i>p</i> -hidroxibenzoicos	21
Temperatura, metanol, heptanosulfonato, tampón (fosfato) de pH 3, y flujo	Mezcla simplex de tres disoluciones para estudiar el efecto de las variaciones en la composición	5 bases aromáticas	22
Temperatura, acetonitrilo, metanol, HCl, pendiente del gradiente y flujo (se consideraron los tres primeros factores para maximizar la resolución)	Diseño D-óptimo	Ciclosporina A y 3 metabolitos	23
Temperatura, acetonitrilo y ácido trifluoroacético (cambios colaterales en el pH)	Diseño factorial fraccional y redes neurales	Péptidos neuroprotectivos	24
Temperatura, pH, metanol y tampón (acetato)	Mapeo multi-parámetro en intervalos limitados realizado con Drylab	9 derivados de ácido benzoico	1
Temperatura, pH, acetonitrilo y tampón (acetato) (sólo se optimizó el pH y el contenido en acetonitrilo)	Diseño factorial fraccional, modelización de superficies de respuesta y simplex	5 bloqueantes del canal del calcio del subgrupo de la 1,4-dihidropiridina	25
Temperatura, pH, metanol y trietilamina (la optimización se realizó a temperatura constante)	Diseño factorial fraccional y modelización de superficies de respuesta de pares de variables	Mesilato de imatinib e impureza	26
Temperatura, pH y metanol	Representaciones gráficas de los datos experimentales (sin modelos)	Hidrocloreto de bupivacaína y adrenalina	27
Temperatura, pH, tampón y flujo	Simplex modificado	8 ácidos carboxílicos	28



Los diseños factoriales merecen una mención especial en el campo de la cromatografía. Estrictamente hablando, no se trata de diseños de optimización. Sin embargo, permiten modelizar la retención en muchas situaciones, lo que abre la posibilidad de calcular la resolución (con la limitación de su incapacidad para considerar curvaturas). Por ello, un número considerable de artículos en las Tablas 6.1 y 6.2 incluyen diseños factoriales en la etapa de optimización [5,9,17,18,24–26].

La mayoría de los diseños experimentales expuestos en las Tablas 6.1 y 6.2 son aproximadamente ortogonales y permiten el ajuste de modelos lineales extendidos (i.e. diseños de superficie de respuesta), que consideran términos de un solo factor, términos de interacción y términos cuadráticos:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 \quad (6.1)$$

donde la respuesta ( $y$ ) puede ser tanto la retención como la resolución,  $x_{1-3}$  representan los factores experimentales, y  $b_i$  y  $b_{ij}$  son parámetros de regresión. También se han propuesto modelos basados en ecuaciones mecanicistas [15,16]. Las redes neuronales artificiales representan otra alternativa [8,9,24], donde no existe un modelo explícito sino un conjunto de funciones de transferencia interconectadas, que se hallan asociadas a través de ajustes iterativos continuos de los pesos asignados.

Un proceso de optimización implica encontrar los valores de los factores experimentales que maximizan la resolución, o permiten alcanzar un equilibrio entre la resolución y otros objetivos, como el tiempo de análisis, la eficacia o el consumo de disolvente. Algunos objetivos pueden combinarse mediante funciones de decisión multi-criterio [2,29], o mediante otras estrategias que exploran los efectos combinados [22].

De acuerdo a la información de que disponemos, no parece haberse publicado una verdadera optimización simultánea del contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura. En algunos casos, uno de estos factores se ha fijado al mejor nivel encontrado en un estudio de exploración que incluía otros factores, y se ha estudiado el efecto de otros dos factores [25,26]. En otros casos, los intervalos del factor se han estrechado para conseguir relaciones lineales y se han llevado a cabo los estudios de forma univariante [1]. Se ha publicado un artículo en el que no se utiliza ningún modelo, sino que se realizan un gran número de experiencias de las que se elige la que ofrece la mejor respuesta [27].

En el Capítulo 5, se describe un modelo de retención que considera los efectos combinados del contenido de disolvente orgánico, el pH y la temperatura sobre la retención cromatográfica de los compuestos ionizables, que fue aplicado con éxito para predecir los tiempos de retención de nueve diuréticos ionizables y dos  $\beta$ -bloqueantes. El modelo incluye el efecto de la temperatura y de los equilibrios ácido-base a través de la ecuación de Van't Hoff y de promedios ponderados de los factores de retención de las especies ácida y básica, respectivamente, y es capaz de considerar los desplazamientos en las constantes de protonación inducidos por cambios en el contenido de disolvente orgánico y la temperatura.

En este capítulo, se utiliza el modelo propuesto en el Capítulo 5 para optimizar la separación de mezclas de diuréticos y  $\beta$ -bloqueantes, y evaluar los beneficios asociados a la optimización simultánea del contenido de disolvente orgánico, el pH y la temperatura. En las referencias. [15,16] se encuentran antecedentes del uso de modelos mecanicistas en optimizaciones de tres factores, donde las variables implicadas son el pH y la concentración de disolvente orgánico y tensioactivo en forma de micelas. La estrategia de optimización aplicada, basada en el uso de la pureza de pico y de conceptos relacionados, permite un diagnóstico exhaustivo de la resolución esperada para cualquier sistema cromatográfico, incluyendo el impacto de cada factor en intervalos experimentales amplios, la existencia de interacciones entre los factores y la detección de solutos críticos. Todo esto permite encontrar las condiciones de separación más adecuadas con gran fiabilidad.

## **6.3. Parte experimental**

### **6.3.1. Reactivos**

Se utilizó acetonitrilo (grado HPLC, Scharlab, Barcelona) como modificador orgánico. El pH se tamponó con ácido cítrico 0.1 M (Panreac, Barcelona) y NaOH (Scharlab), midiéndose tras la adición de disolvente orgánico a la fase móvil. Los estudios se realizaron con nueve diuréticos: benztiazida, bumetanida, furosemida, probenecid, triclorometiazida (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), bendroflumetiazida (Davur, Madrid), clortalidona (Ciba Geigy, Barcelona), piretanida (Cusí, Barcelona), y xipamida (Lacer, Barcelona), y dos  $\beta$ -bloqueantes: oxprenolol (Ciba Geigy) y

propranolol (Aldrich, Steinheim, Alemania). Para otros detalles debe consultarse el Capítulo 5.

### **6.3.2. Instrumentación**

Se midió el pH con un potenciómetro que poseía un electrodo combinado de Ag/AgCl/vidrio (Crisol Modelo GPL 22, Alella, Barcelona). El sistema de HPLC (Agilent, Serie 1100, Waldbronn, Alemania) estaba formado por una bomba isocrática, un inyector automático, un detector UV visible y un módulo controlador de temperatura. Las señales se monitorizaron a 254 nm. Las separaciones se llevaron a cabo con una columna Zorbax SB-C18 (150 mm×4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Agilent), protegida con una precolumna (30 mm×4.0 mm) de características similares. El flujo y el volumen de inyección fueron 1 ml min<sup>-1</sup> y 5 µl, respectivamente. La adquisición de datos se realizó con la HPChemStation (Agilent), y el tratamiento matemático con MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, EE.UU.).

### **6.4. Tratamiento de los datos**

El método de optimización aplicado está basado en la maximización del producto de las purezas de pico (i.e. fracciones de pico no solapadas) [30], función objetivo que considera conjuntamente la distribución de los picos cromatográficos (selectividad y tiempo de análisis), sus perfiles (anchura y simetría), y tamaño (que se relaciona con las concentraciones y respuestas instrumentales). Las purezas de pico pueden predecirse mediante simulación con ordenador, y permiten el análisis exhaustivo de las resoluciones esperadas para un sistema cromatográfico (la resolución máxima alcanzable y las correspondientes condiciones cromatográficas, los compuestos incompatibles, los subconjuntos compatibles, etc.). Este concepto ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de optimización, como la búsqueda de condiciones complementarias (fases móviles, columnas o sistemas de separación) [31,32], o las mejores condiciones de separación en casos de baja resolución [33].

### 6.4.1. Predicción de la retención

En el Capítulo 5, sugerimos un modelo de ocho parámetros ( $c_1$ – $c_8$ ) para describir el efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, el pH y la temperatura sobre el factor de retención ( $k$ ) de un soluto:

$$\log k = c_1 + \frac{c_2}{T} + c_3 P_m^N + \log \left( c_4 + \frac{10^{c_5 + c_6 \varphi + \frac{c_7}{T} + c_8 \frac{\varphi}{T}} h}{1 + 10^{c_5 + c_6 \varphi + \frac{c_7}{T} + c_8 \frac{\varphi}{T}} h} (1 - c_4) \right) \quad (6.2)$$

donde  $h$  es la concentración de protones,  $T$  la temperatura absoluta, y  $P_m^N$  el parámetro de polaridad normalizado de la fase móvil, que depende de la fracción volumétrica de disolvente orgánico ( $\varphi$ ). Este parámetro fue propuesto asociado a un modelo en el que se dividía la contribución polar a la retención del soluto, fase estacionaria y fase móvil [34]. Para mezclas de acetonitrilo-agua,  $P_m^N$  se describe como:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.068 \varphi}{1 + 1.341 \varphi} \quad (6.3)$$

En la Ecuación (6.2), la dependencia del logaritmo del factor de retención con  $T$  está basada en la ecuación de Van't Hoff, como también ocurre con la constante de protonación,  $\log K$  (i.e. el exponente que contiene los parámetros  $c_5$ – $c_8$  y que coincide con  $\text{p}K_a$ , el logaritmo de la constante de disociación cambiado de signo). Se asume que  $\log K$  depende no sólo de la temperatura, sino también del contenido de disolvente orgánico, y se tiene en cuenta la interacción entre estos dos factores. El uso de  $P_m^N$  en lugar de  $\varphi$  permite extender el intervalo de linealidad de  $\log k$ , lográndose una calidad de predicción similar a la del modelo cuadrático  $\log k$  versus  $\varphi$  [34], con un parámetro menos.

### 6.4.2. Predicción de los perfiles de pico

En nuestro estudio, para un mayor realismo, consideramos la existencia de posibles variaciones en el perfil de pico con la composición de la fase móvil. Con el fin de proponer un tratamiento general, se consideraron picos cromatográficos asimétricos. La información disponible para predecir los perfiles de pico para cualquier soluto, en cualquier fase móvil, fue: (i) tiempos de retención, predichos a partir de la Ecuación (6.2) y el valor de tiempo muerto, (ii) áreas de pico iguales para todos los picos, y (iii) semianchuras frontal ( $A$ ) y de cola ( $B$ ) medidas al 10% de la altura del pico, que se calcularon a partir de la definición de eficacia ( $N$ ) y factor de asimetría ( $f_{B/A}$ ) [35], utilizando valores interpolados a partir de los obtenidos para las cuatro fases móviles más cercanas pertenecientes al diseño experimental.

Se utilizó el modelo gaussiano linealmente modificado (PMG1) para predecir los perfiles de pico [36]:

$$h(t) = h_0 \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R)} \right)^2 \right] \quad (6.4)$$

donde  $h(t)$  y  $h_0$  son la altura del pico al tiempo  $t$  y en su máximo, respectivamente;  $t_R$  es el tiempo de retención,  $s_0$  la desviación estándar de un pico gaussiano construido con las características del máximo, y  $s_1$  un parámetro de distorsión que es positivo para picos que forman colas y negativo para los que la deformación es frontal.

Se alteró la formulación original del modelo PMG1 para resolver su problema intrínseco de incrementar la línea base fuera de la región del pico. Con este propósito, se calcularon dos funciones exponenciales auxiliares, sujetas a la condición de que las derivadas de las funciones PMG1 y de las funciones exponenciales coincidiesen al 10% de la altura del pico, a ambos extremos del mismo. Esto significa que la exponencial izquierda debería poseer la misma pendiente que la función PMG1 a  $t = t_R - A$ , mientras que la exponencial derecha debería poseer la misma pendiente que la función PMG1 a  $t = t_R + B$ . En un trabajo anterior, se propuso un planteamiento similar orientado a problemas de deconvolución, con resultados muy satisfactorios [37]. Aquí se presenta el método orientado a la predicción del perfil de los picos, donde la información es más limitada.

La caída exponencial para  $t < t_R - A$  se obtuvo a partir de:

$$h = c_{1,izquierda} \exp [c_{2,izquierda} (t - t_R)] \quad (6.5)$$

$$c_{2,izquierda} = \frac{s_0 A}{(s_0 - s_1 A)^3} \quad (6.6)$$

$$c_{1,izquierda} = 0.1 h_0 \exp(c_{2,izquierda} A) \quad (6.7)$$

mientras que la caída exponencial para  $t > t_R + B$  se calculó como:

$$h = c_{1,derecha} \exp [c_{2,derecha} (t - t_R)] \quad (6.8)$$

$$c_{2,derecha} = -\frac{s_0 B}{(s_0 + s_1 B)^3} \quad (6.9)$$

$$c_{1,derecha} = 0.1 h_0 \exp(c_{2,derecha} B) \quad (6.10)$$

donde:

$$A = \sqrt{\frac{41.7 t_R^2}{N (1.25 + f_{B/A})}} \frac{1}{1 + f_{B/A}} \quad (6.11)$$

y  $B$  se obtiene multiplicando  $A$  por el factor de asimetría ( $f_{B/A}$ );  $c_{1,izquierda}$ ,  $c_{2,izquierda}$ ,  $c_{1,derecha}$  y  $c_{2,derecha}$  son los parámetros que definen las funciones exponenciales auxiliares.

A pesar de la aparente complejidad, es sencillo implementar todas estas funciones en un lenguaje de programación, y merece la pena el grado de realismo que este modelo de pico le confiere al sistema de optimización.

### **6.4.3. Predicción de la resolución**

Las ecuaciones de las Secciones 6.4.1 y 6.4.2 permiten la predicción de los perfiles de pico en un cromatograma para una determinada condición experimental, a partir de los cuales es posible calcular las purezas de pico individuales. La calidad de la separación global (i.e. pureza de pico global) se obtuvo multiplicando los valores individuales. Este proceso se aplicó a una distribución sintética y uniforme de condiciones experimentales. Los intervalos considerados para cada factor fueron: 25–45% de acetonitrilo, pH 3–7, y 20–50°C, con 51 niveles por factor ( $51^3 = 132,651$  fases móviles sintéticas).

## 6.5. Resultados y discusión

### 6.5.1. Descripción del comportamiento cromatográfico

La mezcla analizada consistía en 11 compuestos ionizables con un comportamiento ácido-base muy diverso, que se citan a continuación de acuerdo a su acidez (los valores de  $\log K$  en agua se indican entre paréntesis): los diuréticos probenecid (3.4), bumetanida (3.6, 7.7), furosemida (3.8, 7.5), piretanida (4.1), xipamida (4.8, 10.0), benzotiazida (6.0), triclorometiazida (7.3, 8.6, 10.6), bendroflumetiazida (9.0) y clortalidona (9.3), y los  $\beta$ -bloqueantes oxprenolol (9.5) y propranol (9.5). Este conjunto constituye un problema de separación particularmente complejo debido a:

- (i) el número de factores experimentales (i.e. contenido de acetonitrilo, pH y temperatura) que afecta a la retención y a la selectividad,
- (ii) el muestreo incompleto del proceso de protonación ofrecido por el diseño experimental para algunos solutos,
- (iii) los entrecruzamientos múltiples entre picos a valores de pH cercanos al logaritmo de las constantes ácido-base de los solutos, y
- (iv) la dependencia compleja del proceso de protonación (y en consecuencia, de las curvas  $k$  versus pH) con el contenido de disolvente orgánico y la temperatura.

En todos los casos, la especie neutra era la más retenida (i.e. la especie ácida para los diuréticos, y la especie básica para los  $\beta$ -bloqueantes). Para estos últimos pudo medirse sin problemas la retención de la especie protonada. Para algunos diuréticos, se alcanzó la retención de esta especie en el nivel de acidez máximo ( $\text{pH} = 3$ ), al menos para ciertas combinaciones de contenido de acetonitrilo y temperatura. Para otros, el punto de inflexión de las curvas de protonación quedaba dentro del dominio explorado y este valor pudo extrapolarse con suficiente exactitud. El establecimiento de la retención de las especies básicas,  $k_A$ , resultó más problemático, ya que la mayoría de los compuestos débilmente ácidos o básicos no quedaron bien muestreados en la zona básica del dominio experimental (que abarcó hasta  $\text{pH} = 7$ ). Por lo tanto, el muestreo fue correcto para los siguientes ácidos débiles: bumetanida, furosemida, piretanida, probenecid y xipamida (con  $\log K = 4.5\text{--}5.5$ ), mientras que para la benzotiazida y la triclorometiazida (con

$\log K > 5.5$ ) fue incompleto. El muestreo de oxprenolol y propranolol también resultó incompleto.

Debe llamarse la atención sobre el hecho de que las constantes de protonación de la mayoría de compuestos polipróticos se hallan suficientemente separadas para evidenciar tan sólo un único proceso de protonación en una ventana de pH convencional de cuatro unidades (i.e. 3–7), pero compuestos polipróticos con constantes más próximas podrían procesarse también como compuestos monopróticos, ya que las especies cargadas se retienen escasamente. Esto significa que tan sólo la transición que implique una especie neutra será significativa en términos de retención.

### **6.5.2. Diseño experimental**

Se desarrollaron cinco experiencias iniciales (Tabla 6.3, filas superiores) para establecer un diseño que permitiera explorar los intervalos de los factores que proporcionaran valores de retención adecuados, utilizando modelos lineales simples.

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \frac{1}{T} + c_3 \text{ pH} \quad (6.12)$$

Tras realizar experiencias adicionales, se decidió desplazar el centro del diseño, dando lugar a los siguientes intervalos finales: 25–45% (v/v) de acetonitrilo, pH 3–7 y 20–50°C. Las experiencias siguieron, aproximadamente, un diseño central compuesto (Tabla 6.3, filas inferiores), en el que el diseño de estrella incluía cinco niveles para modelizar curvaturas complejas. Sin embargo, los distintos niveles no se encontraban uniformemente distribuidos. El diseño central compuesto contenía 21 experiencias, tres de las cuales estaban incluidas en el diseño exploratorio. A éstas se añadieron las otras dos experiencias del diseño exploratorio para enriquecer la información. Se realizaron algunas réplicas para asegurar la ausencia de derivas en los tiempos de retención, causadas por la degradación de la columna o debidas a la inestabilidad del instrumento durante el desarrollo del diseño experimental.

Los detalles sobre la validación de la Ecuación (6.2) se dan en el Capítulo 5. La exactitud de este modelo es suficientemente satisfactoria para abordar tareas de predicción con ciertas garantías.



**Tabla 6.3.** Diseño experimental.

Punto del diseño	Acetonitrilo (v/v, %)	Temperatura (°C)	pH
Experiencias previas <sup>a</sup>			
1 Cubo	25	50	3.27
2 Estrella ( $\varphi$ )	40	30	5.40
3 Estrella ( $\varphi$ )	45	30	5.61
4	30	30	3.22
5	30	45	5.20
Diseño central compuesto			
1 Centro	35	30	5.26
2 Cubo	25	20	3.21
3 Cubo	25	20	7.14
4 Cubo	25	50	3.18
5 Cubo	25	50	7.62
6 Cubo	45	20	3.38
7 Cubo	45	20	7.35
8 Cubo	45	50	3.42
9 Cubo	45	50	7.28
10 Estrella ( $\varphi$ )	25	30	5.11
11 Estrella ( $\varphi$ )	30	30	5.20
12 Estrella ( $\varphi$ )	40	30	5.53
13 Estrella ( $\varphi$ )	45	30	5.54
14 Estrella ( $T$ )	35	20	5.42
15 Estrella ( $T$ )	35	25	5.42
16 Estrella ( $T$ )	35	40	5.42
17 Estrella ( $T$ )	35	50	5.42
18 Estrella (pH)	35	30	3.63
19 Estrella (pH)	35	30	4.10
20 Estrella (pH)	35	30	6.08
21 Estrella (pH)	35	30	7.25

<sup>a</sup> Los puntos 1–3 coinciden con puntos en el diseño central compuesto.

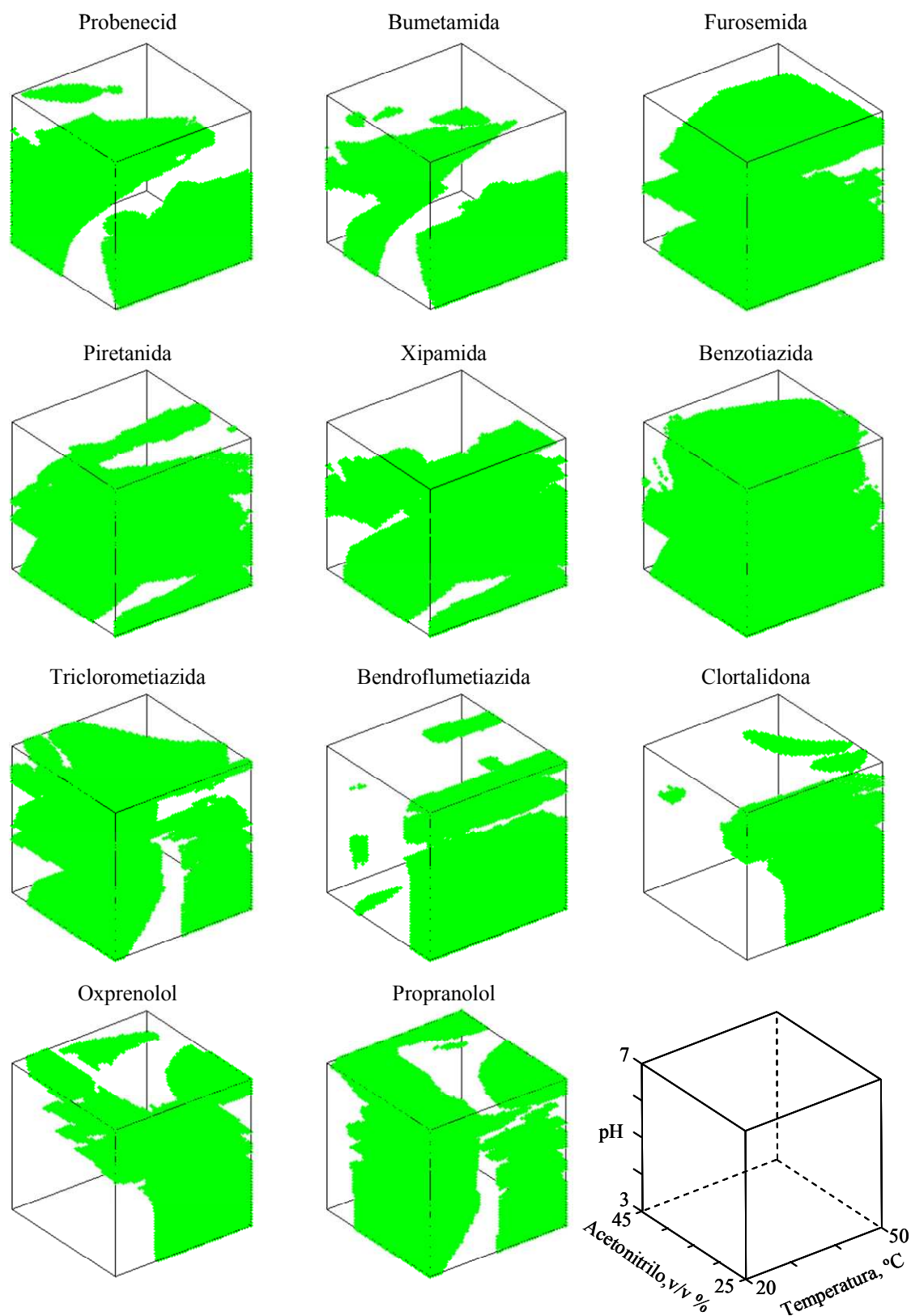
### 6.5.3. Gráficos de resolución

En la optimización cromatográfica de compuestos ionizables, el factor más conveniente para modificar la retención y la selectividad es el contenido de disolvente orgánico (manteniendo constantes el pH y la temperatura), puesto que ejerce un efecto general (a menudo pronunciado) sobre cualquier soluto. Sin embargo, restringir la optimización a un solo factor supone empobrecer las probabilidades de éxito en la separación. Por otro lado, incluso en los casos donde el pH se mantiene constante, las constantes ácido-base pueden modificarse con el contenido de disolvente orgánico (y con la temperatura). Esto afectará a la retención, especialmente a valores de pH próximos al  $pK_a$ . En otras palabras, cuando se varía el contenido de disolvente orgánico, existe un segundo factor subyacente (el pH), que se modifica colateralmente, afectando en diferente proporción a cada soluto en la mezcla.

Se hizo uso de la pureza de pico, que es una función objetivo normalizada, para optimizar la resolución. Este concepto ha permitido el desarrollo de herramientas útiles para explorar las expectativas de resolución de un sistema cromatográfico:

- (i) las purzas de pico limitantes elementales, que son las purzas máximas para cada soluto en una mezcla, considerando todas las posibles condiciones experimentales del diseño, y
- (ii) la pureza de pico global limitante, obtenida como el producto de los valores individuales, de forma similar a la pureza de pico global óptima. La pureza de pico global limitante representa la máxima resolución esperada en un sistema cromatográfico. La comparación de los valores óptimos con este límite permite establecer la mejora que puede conseguirse en la resolución para aprovechar en su totalidad la capacidad separadora del sistema.

Se encontró que las purzas de pico individuales limitantes para todos los compuestos de prueba era  $p_{lim,i} = 1$  (con un solapamiento residual por debajo de  $10^{-8}$ ). Esto significa que todos los solutos se resuelven del resto hasta la línea base, al menos en una condición experimental. En la práctica, puede conseguirse la resolución total en más de una condición. La Figura 6.1 muestra las composiciones dentro del diseño experimental que dan lugar a purzas elementales,  $p_i > 0.999$ , lo que supone una separación hasta prácticamente la línea base. Puede observarse que cada compuesto puede separarse hasta la línea base en dominios amplios de condiciones experimentales.



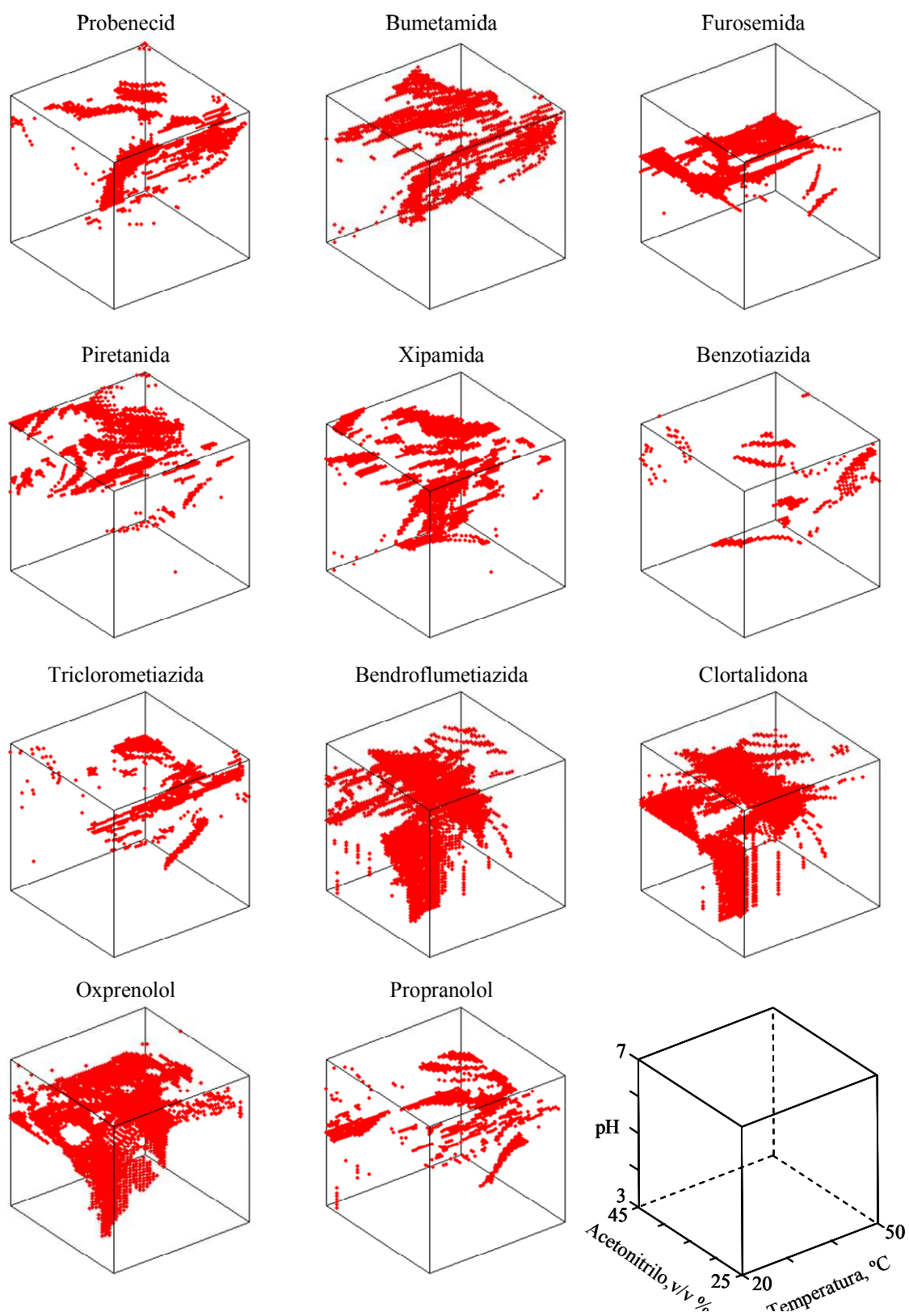
**Figura 6.1.** Condiciones experimentales a las que se prevé la separación hasta prácticamente la línea base, para cada soluto (i.e. purezas de pico elementales,  $p_i \geq 0.999$ ).

En principio, puede esperarse que los ácidos más débiles y los compuestos básicos sean más problemáticos debido a su rápida elución en el intervalo de pH 3–7. De hecho, así es para bendroflumetiazida, clortalidona y oxprenolol, para los cuales las regiones de resolución total tienden a ser más estrechas.

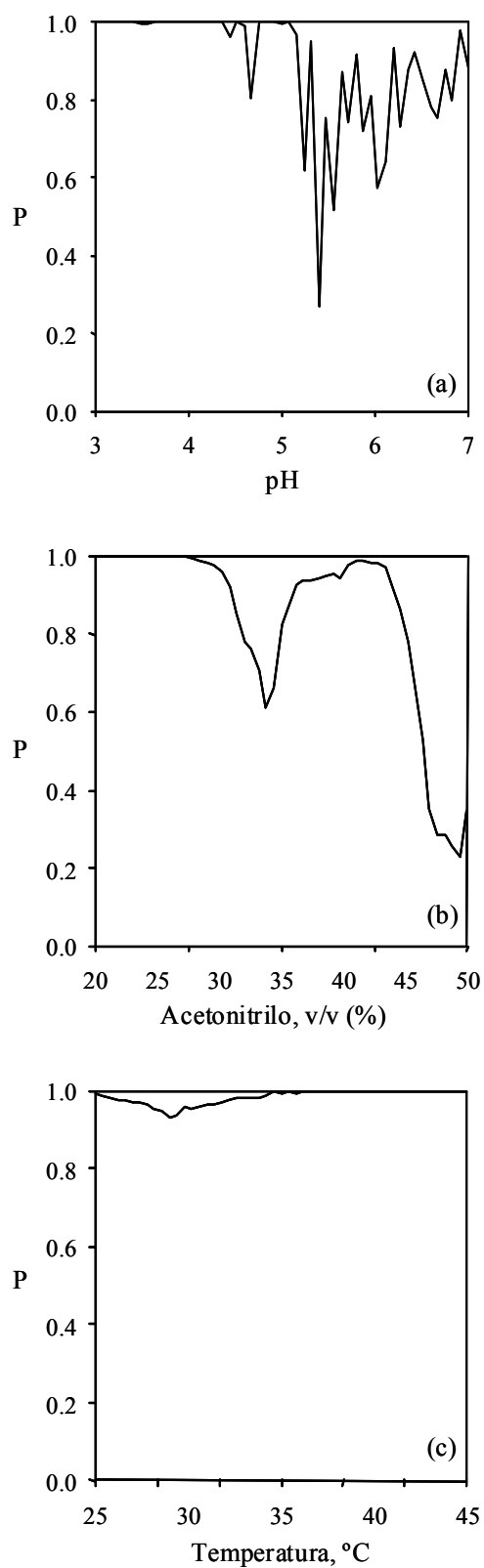
La Figura 6.2 proporciona una perspectiva complementaria. Esta figura representa las condiciones experimentales donde  $p_i < 0.01$ , lo que significa un solapamiento casi completo. Como puede observarse, la extensión de estas regiones es mucho mayor para bendroflumetiazida, clortalidona y oxprenolol. El propranolol, que es un compuesto básico, presenta unas expectativas más favorables. Por otro lado, la benzotiazida es la menos problemática, mientras que la furosemida sólo es problemática a valores de pH intermedios.

La Figura 6.3 representa las purezas de pico globales óptimas ( $P_{opt}$ ) en un dominio sintético de  $51^3$  condiciones simuladas. Cada gráfico muestra la resolución óptima encontrada en los planos que pueden definirse para cada factor por separado (pH, contenido de acetonitrilo y temperatura), pero no las condiciones específicas de los otros factores que permiten alcanzar estas resoluciones. Los gráficos exploran la continuidad de las estructuras de resolución en el espacio de los factores. La extensión de las estructuras con una pureza de pico similar indica el tamaño de las estructuras tridimensionales proyectadas por planos.

El factor más crítico es el pH (Figura 6.3a), ya que las estructuras de pureza son más estrechas. Por encima de pH 5, las estructuras de resolución son tan estrechas que existen pocas posibilidades de encontrar condiciones de separación adecuadas. Además, los errores que provienen de la modelización, junto con las dificultades en implementar las condiciones del cromatógrafo, hacen dudar de estas condiciones.



**Figura 6.2.** Condiciones experimentales a las que se prevé el solapamiento total para cada soluto (i.e. purezas de pico elementales,  $p_i < 0.01$ ).



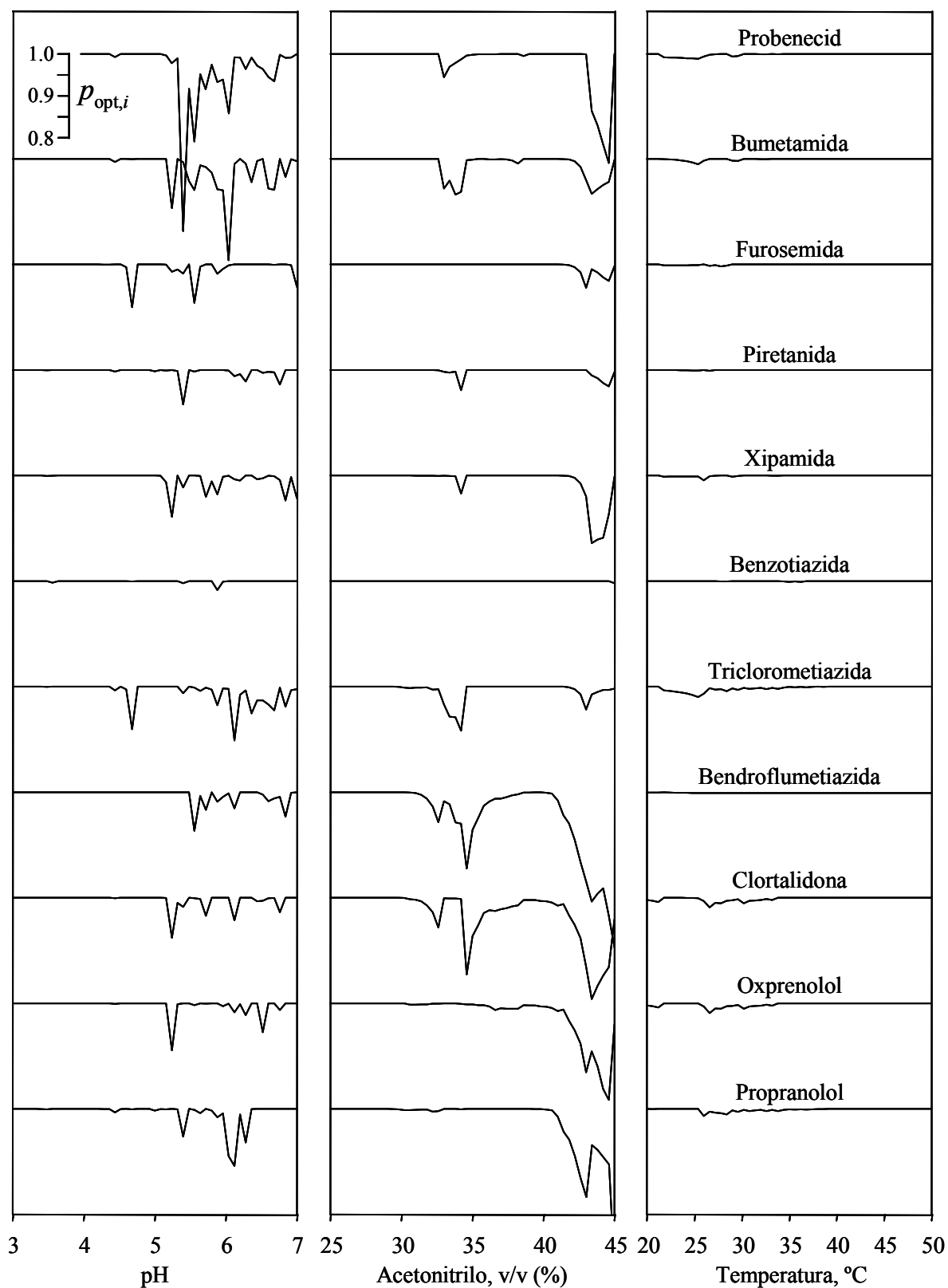
**Figura 6.3.** Purezas de pico globales óptimas ( $P_{\text{opt}}$ ) encontradas en los planos definidos para cada factor: (a) pH (planos acetonitrilo/temperatura); (b) acetonitrilo (pH/temperatura); (c) temperatura (acetonitrilo/pH).

La Figura 6.4a es equivalente a la Figura 6.3a, pero se ha dibujado con las purezas de pico elementales óptimas, en lugar de las globales. Los compuestos más problemáticos son el probenecid y la bumetanida, particularmente el primero. Ambos compuestos son los principales responsables de la ausencia de resolución en una parte significativa del dominio de pH. Puede observarse de nuevo que la benzotiazida es la menos crítica, ya que puede separarse adecuadamente para combinaciones acetonitrilo/temperatura específicas a cualquier pH. Por otro lado, la figura muestra que los tres compuestos mencionados (bendroflumetiazida, clortalidona y oxprenolol) son menos problemáticos de lo que aparecían en las Figuras 6.1 y 6.2.

El segundo factor en importancia es el contenido de acetonitrilo, cuyas proyecciones son más amplias (Figura 6.3b). En este caso, la bendroflumetiazida y la clortalidona son los compuestos más críticos (Figura 6.4b). Finalmente, la temperatura es menos problemática que las otras dos variables bajo el punto de vista de la separación, ya que la velocidad de cambio en la selectividad es inferior (Figura 6.3c). La Figura 6.4c indica que es posible encontrar condiciones específicas de acetonitrilo/pH para resolver cualquier compuesto a cualquier temperatura.

Sin embargo, los resultados obtenidos deben considerarse con cautela, puesto que las proyecciones siempre implican una pérdida de información. A pesar de ello, la Figura 6.3 permite inferir el orden de importancia de los tres factores. Aún más interesante es la observación de ventanas que proporcionan una separación completa: pH 3–4.4 y 4.7–5.1; 25–31% y 38.5–40.2% de acetonitrilo; y 35–50°C. Esto sugiere que el esfuerzo experimental debería centrarse en estas regiones. Sin embargo, hay algunas razones que lo desaconsejan:

- (i) En primer lugar, en el caso de la temperatura, todo el dominio parece válido, por lo que su recorte podría ser perjudicial. Es interesante destacar que la separación mejora al crecer la temperatura, a pesar de que los tiempos de retención sean más cortos.
- (ii) El efecto del contenido de acetonitrilo es menos predecible: la resolución es pobre a contenidos elevados (i.e. por encima del 40%, como era de esperar, ya que al incrementarse la fuerza eluyente se favorece la coelución), pero también lo es en una amplia región intermedia.



**Figura 6.4.** Purezas de pico elementales óptimas encontradas en los planos definidos para cada factor. Para más información, véase la Figura 6.3.



- (iii) En cuanto al pH, la separación se ve claramente favorecida a valores bajos, y en una región intermedia estrecha, especialmente por debajo de pH 4. Sin embargo, el ajuste de los modelos de retención requiere un dominio experimental de pH tan grande como sea posible para modelizar correctamente el comportamiento de retención de las especies ácidas y básicas, lo que es esencial para cada compuesto en la mezcla. Sin embargo, a fin de aumentar la exactitud en la región de mayor resolución, es aconsejable realizar una exploración más detallada a valores de pH bajos.

Los gráficos de las Figuras 6.3 y 6.4 proporcionan una perspectiva parcial de la influencia y el valor de cada factor. El efecto combinado puede ser bastante más complejo. Resolver una mezcla implica equilibrar las necesidades de resolución para todos los solutos simultáneamente, lo que reduce las regiones válidas en el dominio experimental.

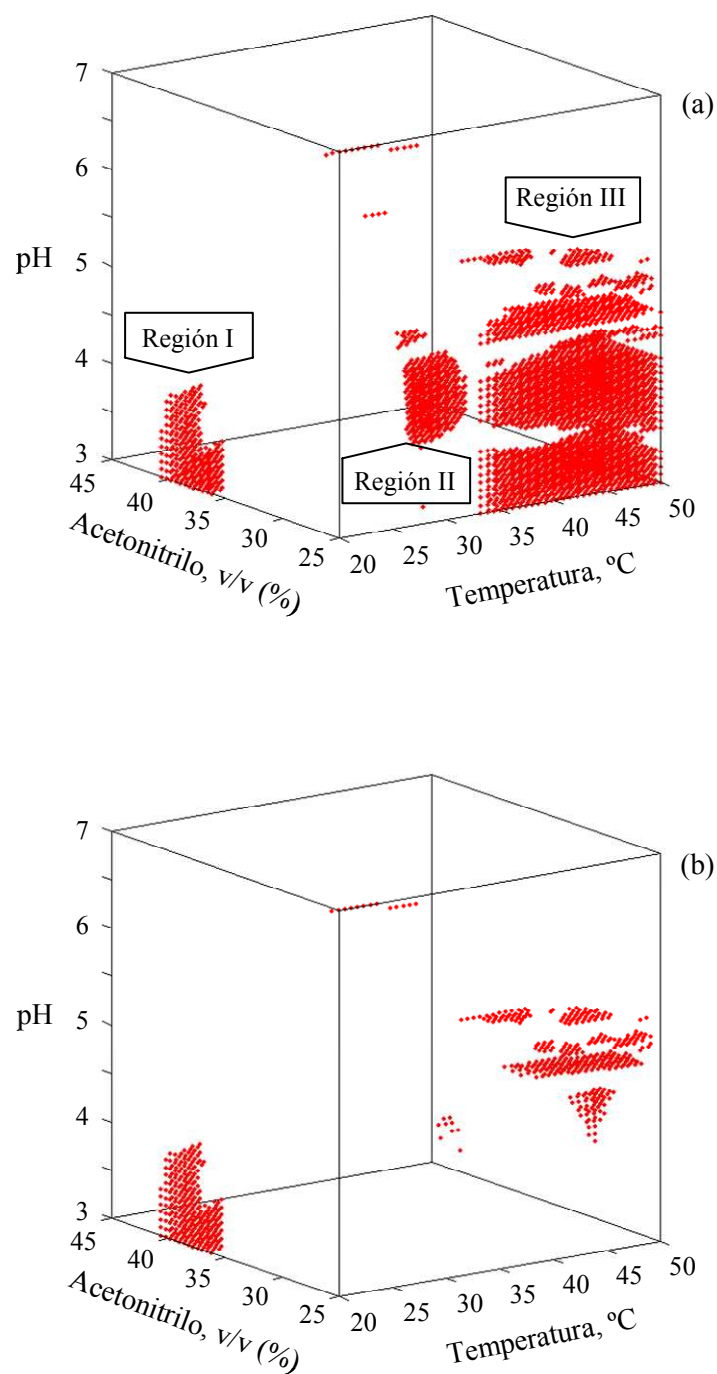
La Figura 6.5a muestra una proyección del impacto combinado de las tres variables, correspondiendo las regiones punteadas a las condiciones experimentales que proporcionan una pureza global  $P \geq 0.95$ . El gráfico ilustra la complejidad del problema de resolución planteado: la mezcla se resuelve únicamente en regiones estrechas del espacio de los factores, que resultarían muy difíciles de encontrar sin la ayuda de una estrategia rigurosa basada en el uso del ordenador.

La Figura 6.6 muestra la evolución de las estructuras de resolución con el cambio en el factor más crítico, el pH. Se muestran cortes de resolución en el intervalo de pH 3–5. Más allá de este intervalo, la separación global se empobrece rápidamente (véase la Figura 6.5a). La combinación de las Figuras 6.5a y 6.6 ayuda a visualizar las posibilidades de separación. Se pueden diferenciar tres regiones de resolución total:

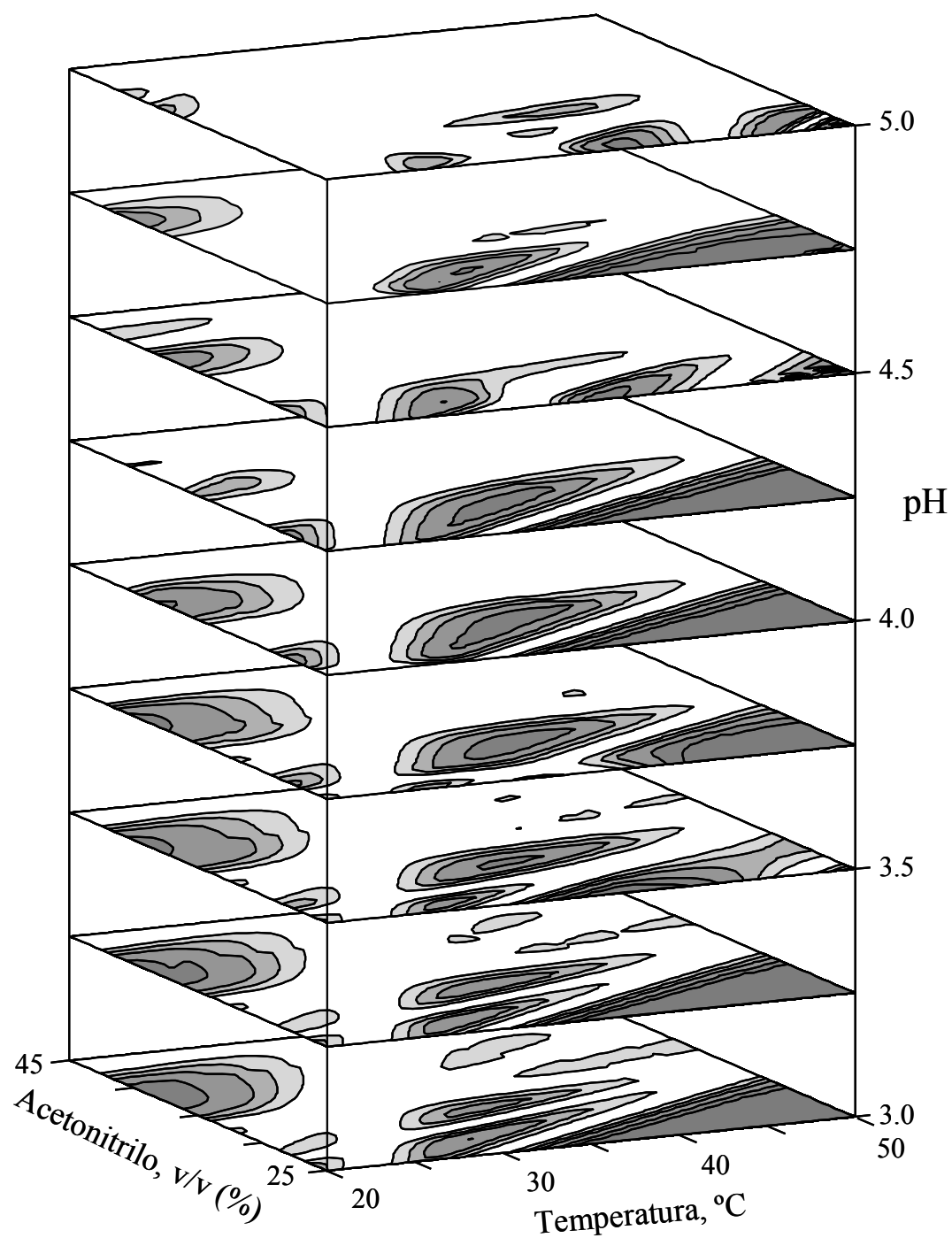
Región I: 36–42% acetonitrilo/20–25°C/pH 3.0–3.7, que es una pequeña región a una temperatura baja y contenido de acetonitrilo elevado.

Región II: 32–40% acetonitrilo/27–30°C/pH 3.5–4.5, correspondiente a una estructura diagonal claramente visible en la Figura 6.6 a un valor de pH relativamente bajo.

Región III: 25–30% acetonitrilo/32–50°C/pH 3.0–4.75, con algunas inversiones de pico en la dirección del pH.



**Figura 6.5.** Diagrama tridimensional mostrando las regiones donde la pureza de pico global es  $P \geq 0.95$ : (a) sin imponer restricciones en el tiempo de análisis, y (b) restringiendo el tiempo de análisis por debajo de 30 min.



**Figura 6.6.** Mapas de contorno detallando la capacidad separadora (purezas de pico globales) en la región ácida.

La Región III es la que a priori se espera que proporcione la mejor separación, debido a la menor fuerza eluyente, aunque curiosamente ocurre a temperaturas altas. Sin embargo, posee el inconveniente de proporcionar tiempos de análisis elevados ( $t_{R,max}$ ). Las condiciones de separación óptimas deberían equilibrar una buena resolución con un tiempo de análisis corto. La Figura 6.5b muestra las condiciones experimentales que proporcionan  $P \geq 0.95$  y  $t_{R,max} < 30$  min. Puede observarse que tan sólo la Región I y las condiciones superiores de la Región III se mantienen en el gráfico. Encontrar estas regiones mediante ensayos de prueba y error o con una estrategia menos exhaustiva que la mostrada aquí resulta bastante improbable.

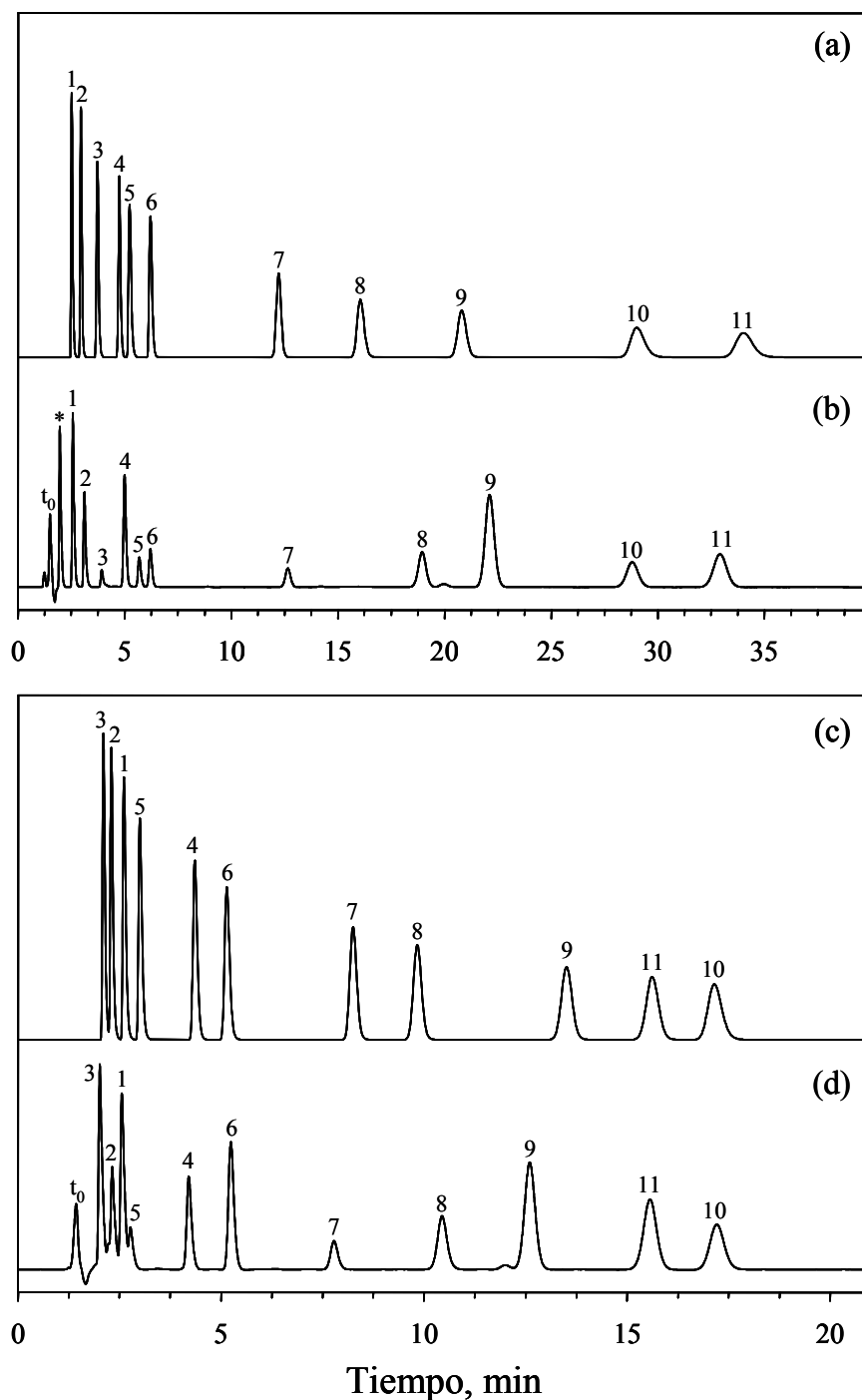
#### **6.5.4. Comparación de los cromatogramas experimentales con los predichos**

La Figura 6.7 ofrece una demostración de la fiabilidad de la optimización de los tres factores. En ella se comparan dos cromatogramas óptimos predichos con los correspondientes experimentales, correspondientes a la Región III (fase móvil A: 29.0% acetonitrilo/50.0°C/pH 4.12, Figura 6.7a y b) y Región I (fase móvil B: 39.4% acetonitrilo/20.6°C/pH 3.00, Figura 6.7c y d). Las purezas globales predichas fueron  $P = 0.9999$  y  $0.9850$ , respectivamente. El orden de elución en los cromatogramas es distinto para algunos compuestos.

El acuerdo entre los cromatogramas predichos y experimentales para ambas fases móviles es bastante satisfactorio, considerando el orden de elución, los tiempos de retención y la resolución. Sin embargo, existen algunas discrepancias entre los tiempos de retención predichos y experimentales para piretanida y xipamida, eluidas con la fase móvil A, y para benzotiazida, piretanida y xipamida, eluidas con la fase móvil B. Con el fin de interpretar este resultado, consideramos la posibilidad de que los mayores errores de predicción correspondieran a solutos que experimentaran la transición entre las especies ácida y básica en una región cercana al pH de la fase móvil. Si así fuera, cambios mínimos en la acidez (i.e. 0.05 unidades de pH) podrían desplazar los picos de manera significativa.

Para comprobar dicha hipótesis, se examinaron las constantes de protonación de los solutos estudiados. Los valores indicados en la Sección 6.5.1 para los compuestos de prueba corresponden a disoluciones acuosas, pero como se ha comentado, el comportamiento ácido-base se ve afectado por el contenido de acetonitrilo y la temperatura. Afortunadamente, el modelo de retención utilizado en este trabajo (Ecuación (6.2)) permite la predicción de los valores de  $\log K$  para combinaciones específicas de contenido de acetonitrilo/temperatura. Así, para 29.0% acetonitrilo/50.0°C (fase móvil A) y 39.4% acetonitrilo/20.6°C (fase móvil B), los valores de  $\log K$  fueron, respectivamente: probenecid (4.7, 5.1), bumetanida (4.6, 4.9), furosemida (4.7, 4.7), piretanida (4.2, 4.7), xipamida (5.0, 5.2), benzotiazida (5.7, 5.7), clortalidona (7.5, 8.5), oxprenolol (7.0, 6.7), y propranol (8.6, 7.6). Los valores de  $\log K$  para triclorometiazida y bendroflumetiazida quedan fuera de la ventana de pH en el diseño (i.e. los factores de retención no cambiaron con el pH en la región estudiada).

Para la fase móvil A, cinco solutos poseen un valor de  $\log K$  cercano al pH de la fase móvil (pH = 4.12): probenecid, bumetanida, furosemida, xipamida, y especialmente piretanida. Esto explica, al menos parcialmente, los desplazamientos de los picos para los cuatro solutos más retenidos en los cromatogramas (Figura 6.7a y 6.7b). Debe indicarse que el valor de  $\log K$  para la piretanida coincide prácticamente con el pH de la fase móvil, y en consecuencia, la predicción de su factor de retención es muy crítica. Los desplazamientos en los tiempos de retención para la fase móvil B (pH 3.00) son menores. En este caso, no existen valores de  $\log K$  próximos al pH de la fase móvil. Por lo tanto, debe existir alguna incertidumbre en las predicciones procedente de la etapa de modelización, especialmente con respecto al pH.



**Figura 6.7.** Cromatogramas predichos (a,c) y experimentales (b,d) para: (a) 29.0% acetonitrilo/50.0°C/pH 4.12; (b) 29.0% acetonitrilo/50.0°C/pH 4.11; (c) 39.4% acetonitrilo/20.6°C/pH 3.00; (d) 39.2% acetonitrilo/20.9°C/pH 3.02. Compuestos de prueba: (1) bendroflumetiazida, (2) clortalidona, (3) oxprenolol, (4) triclorometiazida, (5) propranolol, (6) furosemda, (7) benzotiazida, (8) piretanida, (9) xipamida, (10) probenecid, y (11) bumetanida. El asterisco en (a) corresponde a un pico de degradación de la bendroflumetiazida.

## 6.6. Conclusiones

El uso del pH como factor de separación es particularmente problemático, ya que su efecto sobre la retención puede no ser asumido correctamente por los modelos polinomiales usualmente aplicados en los diseños factoriales, excepto en intervalos muy estrechos que no permiten un aprovechamiento completo de su impacto sobre la selectividad. El modelo mecanicista propuesto es capaz de predecir la retención con suficiente exactitud para enfrentarse a optimizaciones que impliquen a los tres factores experimentales (contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura), considerando sus interacciones mutuas. Los modelos polinomiales requieren un mayor número de parámetros para conseguir una exactitud similar, el riesgo de sobreajuste es mucho mayor y el dominio experimental válido es más estrecho. La estrategia de optimización expuesta, basada en el concepto de pureza de pico como función cromatográfica objetivo y en el modelo mecanicista, fue capaz de encontrar las condiciones más adecuadas donde la resolución es total, y explicar con detalle la capacidad separadora del sistema cromatográfico, teniendo en cuenta las particularidades de cada compuesto.

Se muestra aquí la aplicación de la estrategia de optimización a un problema complejo, donde los solutos presentan una variedad de fuerzas ácido-base y el comportamiento de protonación sufre desplazamientos con el contenido de acetonitrilo y la temperatura, lo que origina múltiples inversiones de pico. El sistema logra la resolución total en tiempos de análisis razonables sólo en dominios estrechos del espacio de los factores. La resolución de problemas de este tipo con combinaciones de sólo dos factores puede ser arriesgado, excepto si el tercer factor se fija a un nivel adecuado. Debe llamarse la atención sobre el hecho de que la temperatura es un factor útil en el problema planteado, aunque su impacto es menor que el del contenido de disolvente y el pH.

El orden de importancia de los tres factores estudiados y su impacto sobre la selectividad depende del compuesto y de la región del dominio experimental. Para un determinado compuesto, el pH es el factor más crítico en las cercanías de las transiciones ácido-base, que cubren cerca de dos unidades de pH para cada compuesto. El problema se magnifica debido al hecho de que el contenido de disolvente orgánico y la temperatura afectan a la fuerza ácido-base de los solutos. Si la mezcla contiene varios compuestos con comportamientos ácido-base particulares, la combinación de los efectos mencionados anteriormente produce estructuras de resolución estrechas, lo que se traduce en una

optimización crítica. Además, la implementación de la separación óptima predicha será costosa.

Hemos supuesto que las predicciones de retención son estrictamente exactas. Por otro lado, el efecto de fuentes incidentales de error fue examinado tan sólo contrastando las separaciones predichas y las experimentales. Esto significa que se ha ignorado la existencia de errores asociados a la etapa de modelización de la retención y al traslado de las condiciones óptimas al cromatógrafo. Una búsqueda más realista de las condiciones óptimas de separación requeriría la inclusión de estas dos fuentes de error. Finalmente, el diseño experimental aplicado a la optimización fue el utilizado en la propuesta y validación del modelo de retención mencionado en el Capítulo 5. Se trataba de un diseño necesariamente exhaustivo para garantizar un examen adecuado de las ecuaciones candidatas. Ciertamente, el pH es un factor mucho más problemático que los otros, lo que implica que un diseño hipotético óptimo debería considerarlo preferentemente. Esta consideración puede permitir aumentar la capacidad de información del diseño, y reducir incidentalmente, el número de experiencias.

## 6.7. Referencias

1. J.W. Dolan, D.C. Lommen, L.R. Snyder, J. Chromatogr. 535 (1990) 55.
2. T. Sivakumar, R. Manavalan, C. Muralidharan, K. Valliappan, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 1842.
3. P. Chaminade, A. Baillet, D. Bayloq-Ferrier, Analusis 22 (1994) 55.
4. S. Pichini, I. Altieri, A. R. Passa, M. Rosa, P. Zuccaro, R. Pacifici, J. Chromatogr. A 697 (1995) 383.
5. H.B. Wan, W.G. Lan, M.K. Wong, C.Y. Mok, Anal. Chim. Acta 289 (1994) 371.
6. M. Zecevic, L.J. Zivanovic, S. Agatonovic-Kustrin, D. Ivanovic, M. Maksimovic, J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 1.
7. M. Zecevic, L. Zivanovic, S. Agatonovic-Kustrin, D. Minic, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 1019.
8. J. Havlis, J.E. Madden, A.L. Revilla, J. Havel, J. Chromatogr. B 755 (2001) 185.
9. J.S. Kiel, S.L. Morgan, R.K. Abramson, J. Chromatogr. 485 (1989) 585.



10. P.M.J. Coenegracht, Nguyen-Van-Tuyen, H.J. Metting, P.J.M. Coenegracht-Lamers, *J. Chromatogr.* 389 (1987) 351.
11. V. Harang, D. Westerlund, *Chromatographia* 50 (1999) 525.
12. E. Marengo, M.C. Gennaro, V. Gianotti, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 53 (2000) 57.
13. B. Do, S. Robinet, D. Pradeau, F. Guyon, *Analyst* 126 (2001) 594.
14. H.B. He, R.J. Deegan, M. Wood, A.J.J. Wood, *J. Chromatogr.* 574 (1992) 213.
15. J.R. Torres Lapasió, D.L. Massart, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Chromatographia* 51 (2000) 101.
16. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 321.
17. M. Zecevic, D. Minic, D. Stojic, L. Zivanovic, I. Ivanovic, *Pharmazie*. 59 (2004) 175.
18. P. Wester, J. Gottfries, K. Johansson, F. Klinteback, B. Winblad, *J. Chromatogr. Chromatogr.* 415 (1987) 261.
19. E. Marengo, M.C. Gennaro, S. Angelino, *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 47.
20. M. Fast, P.H. Culbreth, E.J. Sampson, *Clin. Chem.* 28 (1982) 444.
21. Y.C. Guillaume, E. Peyrin, *Talanta* 51 (2000) 579.
22. J.C. Berridge, *Analyst* 109 (1984) 291.
23. M. Hermann, H. Christensen, J.L.E. Reubsaet, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1263.
24. K. Novotná, J. Havlis, J. Havel, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 50.
25. A.B. Baranda, N. Etxebarria, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, *J. Chromatogr. Sci.* 43 (2005) 505.
26. M. Medenica, B. Jancic, D. Ivanovic, A. Malenovic, *J. Chromatogr. A* 1031 (2004) 243.
27. M. Medenica, D. Ivanović, S. Marković, A. Malenović, D. Misljenović, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 3401.
28. R.M. Marcé, M. Calull, R.M. Manchobas, F. Borrull, F.X. Rius, *Chromatographia* 29 (1990) 54.
29. P.M.J. Coenegracht, A.K. Smilde, H.J. Metting, D.A. Doornbos, *J. Chromatogr.* 485 (1989) 195.

30. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 308.
31. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 876 (2000) 17.
32. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, Chromatographia 56 (2002) 699.
33. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1089 (2005) 170.
34. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 955 (2002) 19.
35. J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 55 (1983) 730.
36. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chem. 69 (1997) 3822.
37. G. Vivo Truyols, J.R. Torres Lapasió, A.M. van-Nederkassel, Y. vander-Heyden, D.L. Massart, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 146.

## Capítulo 7

### **Optimización interpretativa del contenido de disolvente orgánico y del flujo en la separación de $\beta$ -bloqueantes con una columna Chromolith RP-18e**

#### **7.1. Resumen**

Se examina exhaustivamente el comportamiento cromatográfico de una columna Chromolith RP-18e en la separación de un grupo de compuestos básicos ( $\beta$ -bloqueantes) con fases móviles isocráticas de acetonitrilo-agua, a valores de flujo crecientes de hasta 6 ml min<sup>-1</sup>. En estas condiciones, al incrementarse el flujo a una composición fija de la fase móvil, la distribución de los picos (selectividad) se mantuvo, pero las anchuras relativas de cada pico se incrementaron significativamente. Esto redujo la resolución a valores insatisfactorios para compuestos con elución próxima. Así, para las columnas monolíticas, además de la composición de la fase móvil, el flujo se convierte en un factor importante para ser optimizado. Puesto que, teóricamente, los factores de retención ( $k$ ) son independientes del flujo, el modelo cuadrático clásico que relaciona log  $k$  con el contenido de disolvente orgánico es también adecuado para predecir la retención para cualquier combinación de contenido de disolvente orgánico y flujo. Las pequeñas desviaciones encontradas para los compuestos más retenidos se corrigieron mediante la inclusión en el modelo de un término adicional que correlaciona linealmente log  $k$  con el flujo. La predicción de los cambios en la forma de los picos y en la resolución se efectuó utilizando relaciones aproximadamente lineales entre las semianchuras de pico y los tiempos de retención, que ofrecieron parámetros de ajuste similares para picos eluidos a diferentes contenidos de disolvente orgánico y valores del flujo. Se verificó experimentalmente la exactitud de las predicciones en condiciones críticas.

## 7.2. Introducción

En los últimos años, las columnas monolíticas de base sílice han sido objeto de gran atención en el campo de las separaciones cromatográficas rápidas. Estas columnas se fabrican a partir de una sola pieza o bloque de un material poroso y permeable (i.e. un cilindro de sílice, a través del cual puede fluir la fase móvil), con una gran área superficial que origina una retención significativa de compuestos con bajo peso molecular [1–6]. Durante décadas, las columnas de micropartículas de sílice han sido las más populares en cromatografía líquida convencional de fase inversa (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC). Ello explica el interés por el desarrollo de monolitos basados en este material. Sin embargo, las columnas monolíticas de base sílice son muy difíciles de preparar. Aunque a finales de los años 1970 aparecieron ya artículos informando sobre la preparación de soportes continuos de sílice [7], se han descrito muy pocos éxitos (protegidos por fuertes patentes [8–10]) de los muchos intentos para desarrollar monolitos de sílice útiles para aplicaciones cromatográficas. La preparación de columnas de cilindros de sílice manejables fue publicada por el grupo de Nakanishi en los años 1991–1992 [11–13]. No obstante, no fue hasta 1996 cuando estos investigadores describieron un monolito de sílice uniforme y altamente poroso (con una estructura bimodal de macroporos y mesoporos), adecuado para su uso en cromatografía líquida [14]. Un estudio cooperativo entre este grupo y los investigadores de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) condujo a la comercialización, en el año 2000, de la primera columna monolítica de base sílice.

Cada monolito de sílice se fabrica individualmente siguiendo un proceso de sol-gel, que supone una serie de etapas. En primer lugar, se prepara un cilindro de sílice recto en un molde mediante la polimerización hidrolítica de tetrametoxisilano de elevada pureza (libre de metales), en ácido acético acuoso y en presencia de un polímero soluble en agua (polietilenglicol) que actúa como generador de poros [15]. Tras su envejecimiento, el cilindro de sílice se somete a un proceso controlado de redistribución de los poros, utilizando para ello amoníaco acuoso a alta temperatura, seguido de un reforzamiento de la red de poros mediante un tratamiento térmico.

Las columnas monolíticas de base sílice no pueden prepararse *in situ* (en contraposición a las columnas monolíticas poliméricas), debido a la contracción del monolito durante las etapas de envejecimiento y secado (e.g. se obtienen cilindros de 4.6

mm de diámetro interno a partir de moldes con un diámetro de 6 mm). Además, no se pueden obtener monolitos rectos de gran longitud, lo que limita la longitud máxima de la columna a unos 15 cm. El monolito de sílice con un diámetro útil para la RPLC convencional debe extraerse del molde y encapsularse dentro de un tubo fabricado con un polímero resistente a los disolventes y a la presión, al que se pueden unir los ajustes de cierre de la columna para su uso en sistemas de cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC). Para la fabricación del tubo, se ha utilizado poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) [16] y poli(éteretercetona) (PEEK). La tecnología desarrollada por Merck emplea PEEK [2]. Una vez encapsulado en un tubo PEEK, se proporciona al cilindro de sílice las cadenas químicas para las separaciones en RPLC, realizando una derivatización *in situ* (e.g. con octadecildimetil(*N,N*-dietilamino)silano para columnas C18), seguido de sililación (protección) con hexametildisilazano [17].

La calidad de la columna monolítica de base sílice depende principalmente de la estructura de la sílice porosa, el tipo de modificación de la superficie y la calidad del encapsulamiento. Este último factor fue un reto durante el desarrollo de estas columnas: el tubo PEEK debe fundirse sobre la superficie exterior de los monolitos de sílice sin destruir la estructura de sílice y sin dejar espacio vacío alguno entre el cilindro de sílice y el tubo. Debe tenerse en cuenta que si quedara algún hueco, la fase móvil fluiría entre el monolito y la pared de la columna, dando lugar a un incremento perjudicial de las anchuras de los picos cromatográficos. El proceso desarrollado proporciona un fuerte sellado y obliga a la fase móvil a fluir a través del monolito [18].

Las columnas monolíticas de base sílice se comercializaron en primicia por Merck, bajo el nombre Chromolith [1]. Hoy en día se hallan disponibles en el mercado las siguientes columnas analíticas: Chromolith Flash RP-18e (25 mm de longitud), Chromolith SpeedROD RP-18e (50 mm) y Chromolith Performance RP-18e, RP-8 y Si (100 mm), junto con las precolumnas Chromolith RP-18e (5 y 10 mm), todas ellas con un diámetro interno de 4.6 mm. Merck también comercializa una columna capilar, Chromolith CapRodTM RP-18e (150 mm de longitud, 0.1 mm de diámetro interno). Más recientemente, Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) ha comenzado a comercializar las columnas Onyx (Silica, C8 y C18 de 100 mm, y 2 y 3 mm de diámetro interno), con autorización de Merck KGaA. Todas estas columnas han estimulado el desarrollo de procedimientos analíticos con columnas monolíticas de base sílice [18].

El proceso sol-gel desarrollado por Nakanishi et al. [10–15] permite un control independiente del tamaño del poro, lo que no es posible en columnas de micropartículas, donde el volumen interpartícula depende fuertemente del diámetro de la partícula. Las columnas Chromolith exhiben macroporos con un tamaño de alrededor de 2.2  $\mu\text{m}$  y mesoporos de unos 13 nm [18,19]. Los macroporos se hallan interconectados a través de canales por los que fluye la fase móvil. Los mesoporos se encuentran en el sólido poroso. Los macroporos confieren a la columna una elevada permeabilidad (i.e. baja resistencia hidráulica). De ahí que se reduzca la presión a la que la fase móvil debe ser bombeada en el interior de la columna para mantener el flujo deseado. Esto hace a estas columnas adecuadas en separaciones rápidas o con muestras altamente viscosas. Por su parte, los mesoporos ofrecen una gran área superficial para el recubrimiento de fase estacionaria. Los macroporos y su conectividad, junto con la estructura de mesoporos, controlan la cinética de transferencia de masa y la eficacia de la columna. El soluto alcanza los poros por convección y no por difusión [20]. A flujos bajos, las columnas Chromolith proporcionan eficacias similares a las de las columnas clásicas de RPLC de micropartículas de 3–5  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero en contraposición con estas columnas, mantienen una elevada eficacia cuando operan a flujos altos [3,14,19–21].

Las columnas Chromolith conllevan algunas preocupaciones o limitaciones:

- (i) Puesto que el proceso de fabricación incluye múltiples etapas, su reproducibilidad “lote a lote” (o incluso, “columna a columna”) podría ser deficiente. Sin embargo, se ha demostrado que es mayor o coincide con los valores obtenidos con columnas de micropartículas [18,22,23].
- (ii) La porosidad total de la matriz monolítica de sílice es superior al 80%, por lo que los analistas pueden realizar las medidas cromatográficas a una presión mucho más baja, con respecto a las columnas de micropartículas convencionales, cuya porosidad total es de aproximadamente un 65%. En teoría, las columnas monolíticas de base sílice pueden operar a flujos elevados de hasta 9–10  $\text{ml min}^{-1}$ , lo que implica una reducción muy significativa del tiempo de análisis. Sin embargo, se utilizan flujos en el intervalo 1–5  $\text{ml min}^{-1}$  por diversas razones. En primer lugar, los fabricantes recomiendan, para el trabajo de rutina, presiones inferiores a 200–250 bar, con el fin de aumentar el tiempo de vida de la bomba y

del sistema de inyección. Además, se han publicado incrementos en la línea base a flujos altos para algunos detectores [20]. Por último, muchas aplicaciones sencillas no requieren flujos elevados, ya que no es necesario que los tiempos de análisis sean extremadamente cortos [24].

- (iii) El envejecimiento de la columna es una preocupación constante en los laboratorios analíticos. Algunos investigadores han comprobado los efectos de la exposición de las columnas Chromolith a frecuentes cambios en el pH de la fase móvil (en el intervalo de 3.5 a 7), de temperatura (hasta 45°C), y de flujo (hasta 9 ml min<sup>-1</sup>). Se ha encontrado que los factores de retención y la resolución permanecen casi constantes, al menos tras 300 inyecciones [24].
- (iv) La temperatura máxima de operación recomendada por el fabricante de las columnas Chromolith es 45°C. Esta restricción se debe principalmente al riesgo de deformación de la cubierta de polímero orgánico.
- (v) Los tiempos de elución rápidos a flujos elevados requieren un detector y un sistema de adquisición de datos con una frecuencia de muestreo elevada, para monitorizar los picos adecuadamente. Con fines cuantitativos, particularmente para picos que eluyen tempranamente a flujos elevados (8–9 ml min<sup>-1</sup>), períodos de muestreo de 100 ms pueden no ser suficientemente cortos para reconstruir los perfiles de pico.
- (vi) El riesgo existente de dañar las columnas de micropartículas debido a movimientos en el interior de la columna desaparece en las columnas Chromolith, debido a su propia naturaleza. Además, se espera que el riesgo de obstrucción no sea tan grande como en las columnas de micropartículas [5]. Las columnas Chromolith parecen ser más resistentes al daño producido por muestras reales complejas, por lo que no es necesario realizar una limpieza de la muestra tan exhaustiva. Esto es particularmente útil para las muestras de origen biológico o clínico.
- (vii) Por último, las Chromolith son columnas de base sílice, por lo que no pueden ser utilizadas a valores de pH bajos o elevados.

A pesar de las expectativas sobre las columnas Chromolith, su uso práctico no ha sido tan extenso como se esperaba. La razón podría ser que se necesita una información más exhaustiva para conocer su comportamiento en un intervalo amplio de condiciones cromatográficas, así como una interpretación consistente de los resultados. Esto puede conseguirse a través de estudios de modelización de la retención y forma de pico. En este capítulo, aplicamos este punto de vista para examinar las propiedades de separación de una columna Chromolith Performance RP-18e bajo condiciones isocráticas, variando la composición de la fase móvil y el flujo, y utilizando un grupo de fármacos básicos ( $\beta$ -bloqueantes) como compuestos de prueba.

### **7.3. Parte experimental**

#### **7.3.1. Reactivos**

Se examinó el comportamiento cromatográfico de los siguientes  $\beta$ -bloqueantes: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid), atenolol, pindolol, propranolol, timolol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona), esmolol (Du Pont-De Nemours, Le Grand Saconnex, Suiza), labetalol (Glaxo, Tres Cantos, Madrid), metoprolol, y oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona). Acebutolol, carteolol, labetalol, metoprolol y oxprenolol fueron cedidos amablemente por los laboratorios farmacéuticos. La concentración de las disoluciones inyectadas, que permanecieron estables durante al menos dos meses a 4°C, se hallaba próxima a 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se utilizó uracilo como marcador del tiempo muerto (Acros Organics, Geel, Bélgica).

Las fases móviles contenían acetonitrilo (Scharlab, Barcelona). El pH se tamponó a 3.0 mezclando hidrógenofostato disódico 0.01 M y HCl (Panreac, Barcelona). Se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, EE.UU.) para la preparación de todas las disoluciones. Las disoluciones de los fármacos y las fases móviles se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  (Osmonics, Herental, Bélgica), con un diámetro de 47 mm (Magna) y 17 mm (Cameo), respectivamente.



### 7.3.2. Instrumentación y columna

El sistema de HPLC incluía una bomba isocrática (Agilent Serie 1200, Waldbronn, Alemania), un muestreador automático, un controlador de la temperatura fijado a 25°C, y un detector UV-visible (Serie 1100) ajustado a 225 nm, excepto para el timolol que se midió a 300 nm. La frecuencia de muestreo fue de 400 ms. Se utilizó una columna analítica Chromolith Performance RP-18e (100×4.6 mm de diámetro interno), precedida de una precolumna Chromolith RP-18e (5×4.6 mm), ambas de Merck (Darmstadt, Alemania). Se realizaron inyecciones triplicadas, con un volumen de inyección de 20 µl. Para la adquisición de los datos, se utilizó una HPChemStation (Agilent), y para el tratamiento matemático, MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, EE.UU.), o Microsoft Visual Basic 6.0 SP6 (Seattle, WA, EE.UU.).

### 7.4. Resultados y discusión

Las columnas monolíticas permiten la aplicación de diferentes flujos, más allá de los que pueden ser aplicados con las columnas convencionales de micropartículas. Ello es posible debido a las bajas presiones y elevadas eficacias que se consiguen a flujos altos (i.e. curvas de Van Deemter más planas) [3,14,19,21]. El flujo se convierte, por lo tanto, en un factor importante a considerar con estas columnas, además de la composición de la fase móvil, en la búsqueda de condiciones experimentales apropiadas para obtener una buena resolución en tiempos de análisis suficientemente bajos.

La puesta a punto de un método en una columna monolítica a menudo se lleva a cabo a flujos similares a los usuales con columnas convencionales de micropartículas (e.g. 1 ml min<sup>-1</sup>). Si se consigue la separación a ese flujo, el método se acelera manteniendo la composición de fase móvil óptima, e incrementando el flujo hasta el límite operacional o hasta un valor en el que todavía se obtenga suficiente resolución. Generalmente, este proceso se realiza mediante ensayos de prueba y error. Sin embargo, en cromatogramas que contengan pares de picos críticos, al incrementarse el flujo, los picos se hacen relativamente más anchos y la resolución puede deteriorarse pronto. En este caso, para optimizar la separación, puede ser ventajoso el uso de métodos asistidos por ordenador, basados en modelos de retención y de perfil de pico. Estos métodos también permiten

realizar una exploración exhaustiva del comportamiento cromatográfico al modificar los factores experimentales (i.e. contenido de disolvente orgánico y flujo) [25,26].

A continuación, se muestra la aplicación de una metodología asistida por ordenador a la optimización de la resolución para columnas Chromolith. Con este propósito, se consideró la separación de un conjunto de diez  $\beta$ -bloqueantes en una columna Chromolith Performance RP-18e, utilizando mezclas de acetonitrilo-agua a varios flujos, pero el estudio puede extenderse a cualquier otro conjunto de compuestos. El método se basa en la predicción de la retención a cualquier contenido de disolvente orgánico y flujo, haciendo uso de modelos globales que describen tanto la retención como la forma de los picos cromatográficos, permitiendo así una predicción más realista de la resolución.

#### **7.4.1. Descripción del comportamiento cromatográfico**

Con el fin de explorar el espacio de los factores con detalle, se ejecutó un diseño experimental que contenía 20 fases móviles a varios niveles de acetonitrilo y flujo. El contenido de acetonitrilo se varió dentro del intervalo 10–25% (v/v), y el flujo se incrementó en el intervalo 0.5–5 ml min<sup>-1</sup> (a partir de 1 ml min<sup>-1</sup> en intervalos de 1 ml min<sup>-1</sup>) para las fases móviles que contenían 10, 15 y 20% de acetonitrilo, y en el intervalo 0.5–2.5 ml min<sup>-1</sup> para la fase móvil de acetonitrilo al 25%.

Se llevaron a cabo algunas experiencias adicionales a un flujo de 6 ml min<sup>-1</sup>. Este flujo se consiguió en el límite de presión recomendado por el fabricante de la bomba cromatográfica, por lo que no pudo alcanzarse siempre. El controlador del sistema permitía 400 bares para flujos comprendidos entre 0.5 y 5 ml min<sup>-1</sup> (se observó que la presión aumentaba casi linealmente en este intervalo de flujo), mientras que el límite superior de presión disminuía a 200 bares para flujos superiores a 5 ml min<sup>-1</sup>. Por otro lado, la resolución se deterioró de modo significativo para los  $\beta$ -bloqueantes que eluían por debajo de 1 min para flujos por encima de 6 ml min<sup>-1</sup>.

Los errores asociados a la preparación de la fase móvil y a los cambios con el tiempo de su contenido de disolvente orgánico se minimizaron mediante el uso de la misma disolución de fase móvil para realizar las medidas a los distintos niveles de flujo, desde 0.5 a 5 ml min<sup>-1</sup>. Cada serie (i.e. cada nivel de contenido de disolvente) requirió de uno a tres días de trabajo, teniendo en cuenta que se realizaron medidas por triplicado. Para

evitar la evaporación del disolvente en las fases móviles, el reservorio de fase móvil se selló cuidadosamente con Parafilm.

Se utilizaron dos métodos para determinar el tiempo muerto: la detección de la primera perturbación en los cromatogramas y del pico de un marcador (uracilo). En ambos casos, se comprobó que los valores del tiempo muerto eran independientes de la composición de la fase móvil en el intervalo de trabajo, con desviaciones estándar relativas inferiores al 2%.

Para evaluar la repetibilidad de los tiempos de retención experimentales, se realizaron diez réplicas de inyecciones de una disolución que contenía uracilo y tres  $\beta$ -bloqueantes (pindolol, esmolol y labetalol), utilizando acetonitrilo al 20% como eluyente, a diversos flujos. Las medidas se realizaron en un período de 8 horas para evitar cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La media de los tiempos de retención obtenidos y las correspondientes desviaciones estándar relativas (RSD) se muestran en la Tabla 7.1.

Los valores de RSD fueron inferiores al 0.15%, excepto para las medidas realizadas a  $4 \text{ ml min}^{-1}$ . Se descartaron dos medidas realizadas a este valor de flujo, que suponían tiempos de retención anormalmente altos, lo que indicó una reducción ocasional en el flujo de hasta el 5%. En la Tabla 7.1, se puede observar que los valores de RSD crecen con el tiempo de retención, mientras que no puede deducirse una pauta clara cuando se incrementa el flujo.

**Tabla 7.1.** Valores promedio y desviaciones estándar relativas (RSD) para diez inyecciones replicadas de varios compuestos eluidos con una fase móvil de acetonitrilo al 20%, a distintos flujos.

Compuesto	1 ml min <sup>-1</sup>		2 ml min <sup>-1</sup>		3 ml min <sup>-1</sup>		4 ml min <sup>-1</sup>		5 ml min <sup>-1</sup>	
	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)
Uracilo	1.58	0.013	0.79	0.02	0.53	0.04	0.40	0.9	0.32	0.09
Pindolol	2.53	0.04	1.27	0.02	0.85	0.05	0.65	0.9	0.52	0.10
Esmolol	5.18	0.10	2.61	0.05	1.75	0.06	1.34	1.1	1.07	0.08
Labetalol	9.27	0.15	4.68	0.09	3.16	0.08	2.42	1.1	1.94	0.12

### 7.4.2. Predicción de la retención

#### a) Modelos de retención a flujo fijo

El comportamiento de retención en RPLC, a un determinado flujo, puede modelizarse con exactitud a través de la relación cuadrática entre el logaritmo del factor de retención,  $\log k$ , y la fracción volumétrica (v/v) de disolvente orgánico en la fase móvil,  $\varphi$  [25–28]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (7.1)$$

donde  $c_0$ ,  $c_1$ , y  $c_{11}$  son coeficientes de ajuste, con valores característicos para un soluto y un sistema columna/disolvente determinados, y  $k$  se define como:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (7.2)$$

siendo  $t_R$  y  $t_0$  el tiempo de retención y el tiempo muerto, respectivamente. En trabajos previos, encontramos exactitudes cercanas al 1–3% en la descripción de la retención con la Ecuación (7.1), para compuestos de distinta naturaleza, cromatografiados con columnas convencionales de micropartículas y utilizando fases móviles de acetonitrilo-agua a un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  [29,30].

El cálculo de  $k$  (Ecuación (7.2)) implica el desplazamiento del origen de tiempos de retención al tiempo de un compuesto no retenido y la corrección de los efectos del flujo mediante la división por el tiempo muerto. El factor de retención normaliza la retención y permite la comparación de diversas columnas, o de la misma columna a flujos distintos [31], que es el caso de estudio en este trabajo. Por lo tanto, el factor de retención no debería depender del flujo.

Como se ha comentado en la Sección 7.4.1, desarrollamos un diseño experimental en el que el efecto del contenido de disolvente orgánico sobre la retención se examinó a diferentes flujos. Con estos datos, se ensayaron en primer lugar modelos particulares (Ecuación (7.1)) a cada nivel experimental de flujo. La predicción de los tiempos de retención para cualquier contenido de disolvente orgánico se realizó combinando la Ecuación (7.1) y la siguiente expresión:

$$t_R = t_0 (1 + k) \quad (7.3)$$

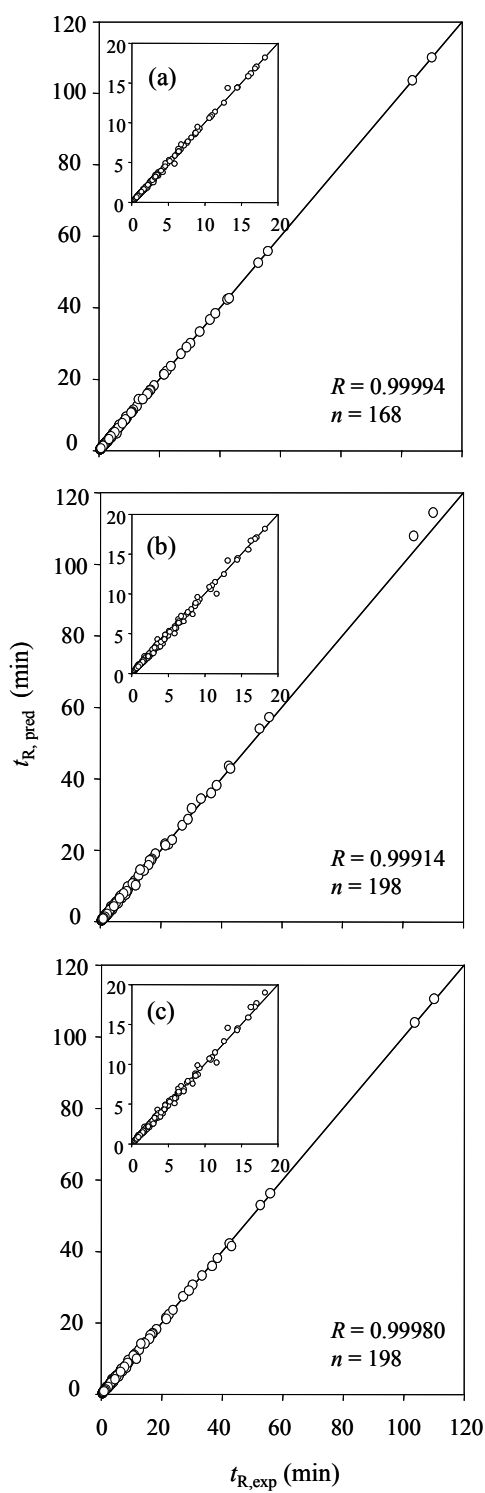
que se deduce de la Ecuación (7.2), utilizando el valor de tiempo muerto experimental obtenido para cada flujo.

La Figura 7.1a muestra la exactitud de las predicciones comparando los tiempos de retención predichos y experimentales, utilizando uracilo como marcador del tiempo muerto. Ésta es la exactitud que se pretende alcanzar con un modelo global, considerando ambos factores, el contenido de disolvente orgánico y el flujo. Como se observa, las predicciones son muy satisfactorias. Sin embargo, el valor de los coeficientes del modelo (Tabla 7.2) depende significativamente del flujo. En un trabajo reciente [32], se encontraron desviaciones en la retención con una columna Chromolith al aumentar el flujo (i.e. los tiempos de retención no se reducían a la mitad cuando se duplicaba el flujo). Los autores interpretaron este comportamiento indicando que su instrumento de HPLC se había fabricado en la “era premonolítica”, por lo que no se había construido para operar a flujos superiores a  $2 \text{ ml min}^{-1}$ , ya que las columnas de HPLC convencionales disponibles no permiten flujos mayores que esos.

La Figura 7.2 muestra los cromatogramas obtenidos a diferentes flujos para los  $\beta$ -bloqueantes eluidos con una fase móvil conteniendo un 20% de acetonitrilo, en el intervalo de flujo  $1\text{--}5 \text{ ml min}^{-1}$  (no se incluyó timolol, cuyo pico solapaba críticamente con los de acebutolol y metoprolol). La escala de tiempos de los cromatogramas se ajustó a un tamaño equivalente para facilitar la comparación. Nótese que con este propósito, en todos los cromatogramas se ha hecho coincidir el máximo del primer y último picos eluidos. Teóricamente, el máximo de todos los picos debería coincidir.

En la Figura 7.3a se representan los tiempos de retención de varios  $\beta$ -bloqueantes frente a la inversa del flujo ( $1/F$ ). Los valores siguen un comportamiento lineal, con coeficientes de regresión  $R > 0.9999$ :

$$t_R = c_0 + \frac{c_1}{F} \quad (7.4)$$



**Figura 7.1.** Exactitud en las predicciones de la retención para los diez  $\beta$ -bloqueantes. Los modelos de retención son: (a) Ecuación (7.1) ajustada manteniendo el flujo fijo, (b) Ecuación (7.1) ajustada considerando distintos flujos, (c) Ecuación (7.6). Los gráficos interiores amplían la región de menores tiempos de retención.

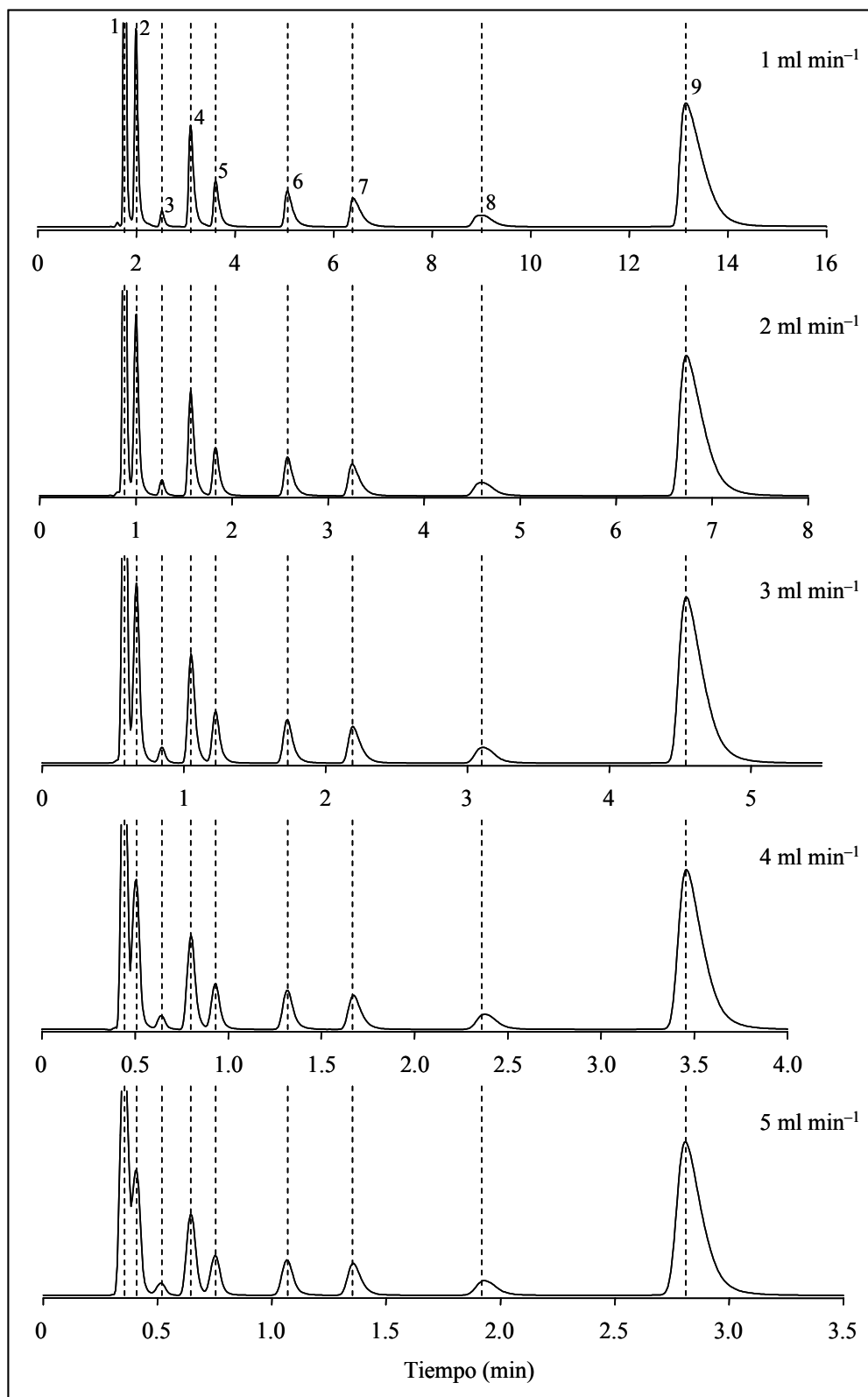
**Tabla 7.2.** Coeficientes de regresión de los modelos cuadráticos individuales (Ecuación (7.1)) para los diez  $\beta$ -bloqueantes eluidos a distintos flujos.

Compuesto	1 ml min <sup>-1</sup>			2 ml min <sup>-1</sup>			3 ml min <sup>-1</sup>		
	$c_0$	$c_1$	$c_{11}$	$c_0$	$c_1$	$c_{11}$	$c_0$	$c_1$	$c_{11}$
Atenolol	0.87	-15.2	30.9	0.79	-13.9	26.9	0.64	-11.2	16.85
Carteolol	1.52	-12.3	9.90	1.48	-11.6	7.25	1.17	-6.64	-10.4
Pindolol	1.03	-5.11	-4.80	1.02	-4.89	-5.47	0.87	-2.32	-15.4
Timolol	2.84	-20.0	28.4	2.88	-20.1	28.5	1.91	-8.89	-3.17
Metoprolol	1.80	-7.93	-1.82	1.80	-7.78	-2.24	1.65	-5.28	-11.8
Acebutolol	2.13	-11.7	5.45	2.22	-12.8	9.09	2.12	-11.0	2.12
Esmolol	2.23	-9.21	-0.19	2.19	-8.65	-1.86	2.07	-6.55	-9.98
Oxprenolol	2.28	-8.48	-1.72	2.14	-6.43	-8.04	1.98	-3.71	-18.4
Labetalol	2.91	-10.99	-0.35	2.81	-9.48	-5.01	2.78	-8.39	-10.2
Propranolol	2.42	-4.15	-17.1	2.48	-4.86	-14.7	2.42	-3.57	-20.6

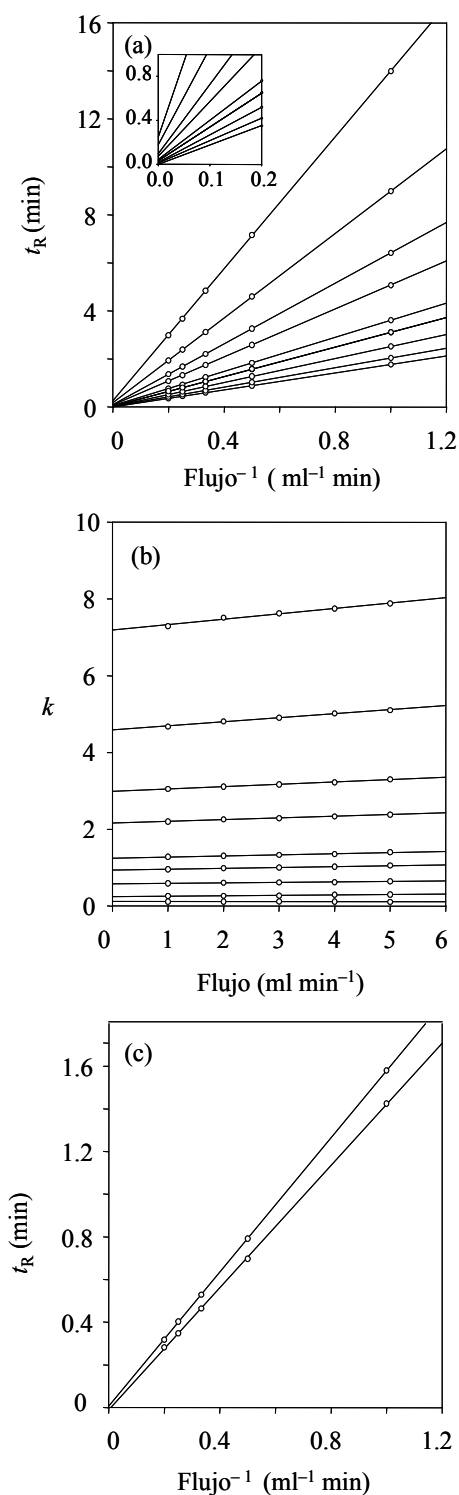


**Tabla 7.2** (continuación)

Compuesto	4 ml min <sup>-1</sup>			5 ml min <sup>-1</sup>			Valores promedio (1–5 ml min <sup>-1</sup> )		
	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>
Atenolol	0.67	-11.4	16.7	0.37	-6.64	-0.48	0.67 ± 0.19	-11.7 ± 3.3	18 ± 12
Carteolol	1.50	-11.3	5.76	1.50	-11.2	5.41	1.43 ± 0.14	-10.6 ± 2.3	3.6 ± 8.0
Pindolol	0.92	-2.94	-13.6	1.01	-4.25	-8.81	0.97 ± 0.07	-3.9 ± 1.2	-9.6 ± 4.8
Timolol	1.90	-8.80	-3.14	1.86	-8.58	-3.06	2.27 ± 0.53	-13.3 ± 6.2	9.5 ± 17.3
Metoprolol	1.72	-6.08	-9.28	1.82	-7.62	-3.82	1.76 ± 0.07	-6.9 ± 1.2	-5.8 ± 4.5
Acebutolol	2.21	-12.1	5.52	2.27	-12.9	8.26	2.19 ± 0.06	-12.1 ± 0.8	6.1 ± 2.7
Esmolol	2.15	-7.62	-6.55	2.24	-8.75	-2.73	2.17 ± 0.07	-8.2 ± 1.1	-4.2 ± 4.0
Oxprenolol	2.02	-4.27	-16.4	2.20	-6.78	-8.14	2.12 ± 0.12	-5.9 ± 2.0	-10.5 ± 6.8
Labetalol	2.74	-7.96	-11.1	2.89	-10.0	-4.51	2.82 ± 0.07	-9.4 ± 1.2	-6.2 ± 4.4
Propranolol	2.53	-5.21	-15.0	2.50	-4.62	-17.0	2.47 ± 0.05	-4.48 ± 0.64	-16.9 ± 2.3



**Figura 7.2.** Cromatogramas experimentales obtenidos con una fase móvil de acetonitrilo al 20% y flujo variable. Compuestos: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) pindolol, (4) acebutolol, (5) metoprolol, (6) esmolol, (7) oxprenolol, (8) labetalol, y (9) propranolol.



**Figura 7.3.** Dependencia respecto al flujo o a la inversa del flujo para: (a) los tiempos de retención del conjunto de  $\beta$ -bloqueantes eluidos con acetonitrilo al 20%, (b) los factores de retención correspondientes, (c) el tiempo de retención del uracilo (línea superior) y tiempo al que aparece la primera perturbación en los cromatogramas (línea inferior). En (a,b), de abajo a arriba: atenolol, carteolol, pindolol, acebutolol, metoprolol, esmolol, oxprenolol, labetalol, y propranolol.

Teóricamente, la ordenada en el origen ( $c_0$ ) debería ser nula, y la pendiente ( $c_1$ ) debería coincidir con el tiempo de retención a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Sin embargo, las rectas ajustadas para los compuestos más retenidos (i.e. esmolol, oxprenolol, labetalol y propranolol) mostraron valores de la ordenada en el origen significativos, que se correlacionaban con la polaridad de los compuestos. Se encontró el mismo comportamiento para otras composiciones de la fase móvil. Así, por ejemplo, para el propranolol eluido con una fase móvil conteniendo 10 y 20% de acetonitrilo:  $c_0 = 2.15$  y  $0.25$ , y  $c_1 = 107.8$ , y  $12.88$ , mientras que los tiempos del pico obtenido a  $1 \text{ ml min}^{-1}$  fueron  $110.0$  y  $13.12$  min, respectivamente. Para el pindolol:  $c_0 = 0.079$  y  $0.017$ , y  $c_1 = 6.16$ , y  $2.50$ , mientras que los tiempos a  $1 \text{ ml min}^{-1}$  fueron  $6.24$  y  $2.52$  min, respectivamente.

La ordenada en el origen positiva es la razón principal de que los tiempos de retención no se reduzcan exactamente a la mitad cuando se duplica el flujo. La consecuencia es que los factores de retención para los compuestos más retenidos dependen del flujo (i.e. cuando se representa  $k$  frente al flujo, las líneas presentan una pendiente positiva, en lugar de aparecer horizontales, con pendiente nula) (Figura 7.3b).

### ***b) Modelo global considerando el contenido de disolvente orgánico y el flujo***

La Ecuación (7.1), combinada con la Ecuación (7.3), puede utilizarse también como un modelo global para describir el comportamiento de retención de los  $\beta$ -bloqueantes en todo el dominio experimental (teniendo en cuenta la composición de la fase móvil y el flujo). Los coeficientes en la Ecuación (7.1) pueden obtenerse a partir de medidas realizadas a flujo fijo, pero también a partir de experiencias realizadas a distintos contenidos de disolvente orgánico y diferentes flujos. De acuerdo a ello, procesamos simultáneamente los datos de todo el dominio experimental (Tabla 7.3).

Tal y como se ha comentado, en teoría, los factores de retención deberían ser independientes del flujo. Esto significa que una vez se han predicho a una cierta composición de fase móvil (a cualquier flujo) de acuerdo a la Ecuación (7.1), la Ecuación (7.3) debería ofrecer el tiempo de retención a cualquier flujo, sustituyendo el valor del tiempo muerto correspondiente que se halla correlacionado con la inversa del flujo.

**Tabla 7.3.** Coeficientes de regresión para modelos de retención globales, ajustados usando simultáneamente los datos de todo el dominio experimental (a valores variables del contenido de disolvente orgánico y del flujo).

Compuesto	Ecuación (7.1)			Ecuación (7.6)			
	$c_0$	$c_1$	$c_{11}$	$c_0$	$c_1$	$c_{11}$	$c_2$
Atenolol	1.60	-26.5	73.4	1.59	-27.0	75.0	0.0119
Carteolol	1.51	-11.8	8.34	1.49	-12.0	9.11	0.0105
Pindolol	1.05	-5.22	-4.64	1.04	-5.36	-4.10	0.0066
Timolol	1.85	-8.91	-0.96	1.82	-8.81	-1.05	0.0085
Metoprolol	1.82	-7.93	-1.98	1.80	-8.07	-1.46	0.0078
Acebutolol	2.24	-12.9	9.06	2.22	-13.0	9.68	0.0102
Esmolol	2.23	-9.08	-0.71	2.22	-9.21	-0.216	0.0080
Oxprenolol	2.19	-7.00	-6.40	2.17	-7.12	-5.92	0.0070
Labetalol	2.88	-10.2	-2.82	2.86	-10.3	-2.40	0.0079
Propranolol	2.53	-5.51	-12.9	2.52	-5.58	-12.6	0.0072

La Figura 7.3c representa los tiempos de la primera perturbación (línea inferior) y del pico del uracilo (línea superior), que se utilizaron para estimar el tiempo muerto, frente a la inversa del flujo. Los coeficientes en la Ecuación (7.4) para la primera perturbación y para el uracilo fueron:  $c_0 = -0.013$  y  $-0.004$ , y  $c_1 = 1.423$ , y  $1.576$ , mientras que los tiempos medidos a  $1 \text{ ml min}^{-1}$  fueron:  $1.410$  y  $1.580$ , respectivamente. Estos resultados muestran que el uracilo es más apropiado para determinar el tiempo muerto, ya que da lugar a una ordenada en el origen casi nula y el valor de la pendiente es más correcto (i.e.  $1.576$  vs.  $1.580$ ). De hecho, se comprobó que las predicciones son peores cuando se hace uso de la primera perturbación, y por ello, se seleccionó al uracilo como marcador del tiempo muerto. La Figura 7.1b muestra la exactitud de la Ecuación (7.1) como modelo

global, que es ligeramente más deficiente que la ofrecida por los modelos individuales a flujo fijo, especialmente para los compuestos más retenidos.

En la bibliografía, existen varios artículos publicados en los que aparecen modelos descriptores de la retención en RPLC para compuestos separados con columnas de micropartículas, que consideran diseños experimentales incluyendo el contenido de disolvente orgánico y el flujo como factores. Estos modelos adoptan la siguiente expresión general:

$$y = c_0 + c_1 \varphi + c_2 F + c_{12} \varphi F + c_{11} \varphi^2 + c_{22} F^2 \quad (7.5)$$

donde la respuesta ( $y$ ) es el tiempo de retención [33,34], o el factor de retención ( $\log k$ ) [35,36].

En base a estos modelos, consideramos el efecto del flujo en el modelo global de la siguiente forma:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 + c_2 F \quad (7.6)$$

La Tabla 7.3 recoge los coeficientes de regresión para la Ecuación (7.6) para los diez  $\beta$ -bloqueantes. La Figura 7.1c muestra la exactitud de las predicciones del tiempo de retención utilizando este modelo, que es similar a la obtenida con los modelos individuales obtenidos para cada flujo (Figura 7.1a).

#### **7.4.3. Predicción de la forma del pico**

Un comportamiento común de las columnas de RPLC, incluyendo las Chromoliths, es la reducción de las eficacias al incrementarse el flujo (i.e. incremento de las anchuras relativas de los picos cromatográficos). Este hecho debería considerarse para conseguir predicciones realistas de los cromatogramas y para el cálculo de la resolución en cualquier condición experimental. Numerosos autores han comentado que raramente se obtienen picos simétricos ideales en RPLC (si es que existen), debido a diversas fuentes intra- y extra-columnares de asimetría [37]. Esto sugiere que los perfiles de elución en RPLC no son descritos adecuadamente utilizando el modelo gaussiano simple. Además, deberían considerarse las posibles variaciones del perfil de pico con la composición de la fase móvil y con otros factores para predecir cromatogramas próximos a los reales.

Se estimaron las eficacias cromatográficas, expresadas como platos teóricos ( $N$ ), de acuerdo con la ecuación de Foley y Dorsey [37]:

$$N = \frac{41.7 \left( \frac{t_R}{A+B} \right)^2}{1.25 + \frac{B}{A}} \quad (7.7)$$

donde  $A$  y  $B$  son las semianchuras frontal y de cola medidas al 10% de la altura del pico. La Ecuación (7.7) incluye la asimetría del pico, descrita mediante la relación entre las semianchuras de cola y frontal ( $B/A$ ).

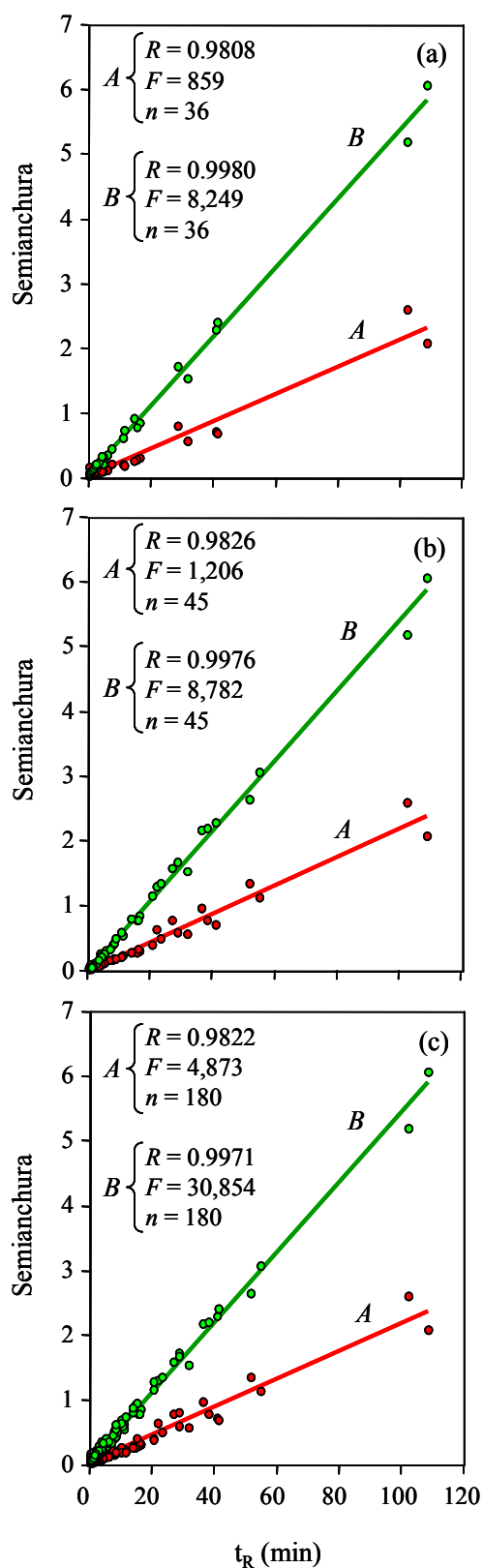
Como se observa en la Figura 7.4, las relaciones entre las semianchuras de pico ( $A$  y  $B$ ) y el tiempo de retención, que son en realidad cuadráticas, pueden aproximarse a líneas rectas en el intervalo experimental de trabajo:

$$A = c_{0,A} + c_{1,A} t_R \quad (7.8)$$

$$B = c_{0,B} + c_{1,B} t_R \quad (7.9)$$

En la Figura 7.4a se muestra el valor de las semianchuras de pico y el tiempo de retención para los  $\beta$ -bloqueantes eluidos a una composición de fase móvil variable y flujo fijo (los resultados corresponden a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , pero se obtuvieron resultados similares para otros flujos), y en la Figura 7.4b se muestran las semianchuras de pico a una composición de fase móvil fija y flujo variable (los resultados corresponden a una fase móvil de acetonitrilo al 10%, pero se obtuvieron resultados similares para otras composiciones de fase móvil). Estas relaciones simples se han utilizado anteriormente con éxito con propósitos de optimización, para predecir la forma del pico (eficacia y asimetría) a flujo fijo, en columnas de micropartículas [38]. Aquí extendemos su uso a las Chromoliths cuando se optimiza también el flujo.

En la Tabla 7.4, se indican los valores de la ordenada en el origen y pendiente para las rectas ajustadas (Ecuaciones (7.8) y (7.9)) para los diez  $\beta$ -bloqueantes eluidos a flujo fijo. Las medias de los parámetros obtenidas promediando los valores a diferentes flujos fueron las siguientes:  $c_{0,A} = 0.0213 \pm 0.0022$  y  $c_{1,A} = 0.0227 \pm 0.0010$ , y  $c_{0,B} = 0.031 \pm 0.019$  y  $c_{1,B} = 0.0562 \pm 0.0024$ . Los coeficientes obtenidos utilizando el conjunto completo de los datos del diseño experimental (Figura 7.4c) fueron:  $c_{0,A} = 0.029$  y  $c_{1,A} = 0.0215$ , y  $c_{0,B} = 0.045$  y  $c_{1,B} = 0.0540$ .



**Figura 7.4.** Dependencia de las semianchuras frontal (A) y de cola (B) con el tiempo de retención para los diez  $\beta$ -bloqueantes. Los datos cromatográficos corresponden a: (a) contenidos de acetonitrilo variables en el intervalo 10–25% y  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , (b) acetonitrilo al 10% y flujo variable en el intervalo 1–5  $\text{ml min}^{-1}$ , (c) diseño experimental completo en los intervalos 10–25% de acetonitrilo y 0.5–5  $\text{ml min}^{-1}$ .



**Tabla 7.4.** Coeficientes de regresión para las relaciones entre las semianchuras y los tiempos de retención (Ecuaciones (7.8) y (7.9)) para los diez  $\beta$ -bloqueantes eluidos a diversos contenidos de disolvente.

Flujo ( $\text{ml min}^{-1}$ )	$c_{0,A}$	$c_{1,A}$	$c_{0,B}$	$c_{1,B}$
1	0.0251	0.0211	0.0655	0.0532
2	0.0211	0.0223	0.0391	0.0533
3	0.0184	0.0225	0.0186	0.0584
4	0.0201	0.0236	0.017	0.0586
5	0.0218	0.0239	0.0161	0.0576

Debe indicarse que la medida de las semianchuras de pico está sujeta a un cierto nivel de incertidumbre, especialmente para los compuestos más apolares (e.g. labetalol y propranolol en el conjunto de  $\beta$ -bloqueantes), debido a la elevada distorsión de los picos en algunas condiciones experimentales. Ésta puede ser la razón de la dispersión observada en los gráficos (Figura 7.4).

Las pendientes de las relaciones entre las semianchuras y los tiempos de retención (ver Ecuaciones (7.8) y (7.9)) proporcionan información sobre la forma de los picos (anchura y asimetría) esperable en una columna. Una mayor pendiente para  $B$  indica una tendencia en los picos a mostrar cola. Los resultados muestran que los valores particulares de eficacia de pico (Ecuación (7.7)) y asimetría para cada compuesto en una determinada condición experimental (contenido de disolvente orgánico y flujo) pueden predecirse a partir de las Ecuaciones (7.8) y (7.9), en combinación con un modelo de retención (Ecuaciones (7.1) o (7.6)) y la Ecuación (7.3). Los parámetros en las Ecuaciones (7.8) y (7.9) pueden obtenerse fácilmente a partir de los datos a un flujo determinado (e.g.  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ).

El perfil de pico se obtuvo utilizando el modelo gaussiano polinomialmente modificado (*polynomially modified Gaussian model*, PMG), que describe con exactitud picos cromatográficos de asimetría diversa [39,40]:

$$h(t) = h_0 \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R)} \right)^2 \right] \quad (7.10)$$

donde  $h(t)$  y  $h_0$  son la altura al tiempo  $t$  y en el máximo del pico, respectivamente, y:

$$s_0 = 0.466 \frac{\sqrt{\frac{41.7 t_R^2}{N (1.25 + B/A)}}}{1 + \frac{1}{B/A}} \left( 1 - \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \right) \quad (7.11)$$

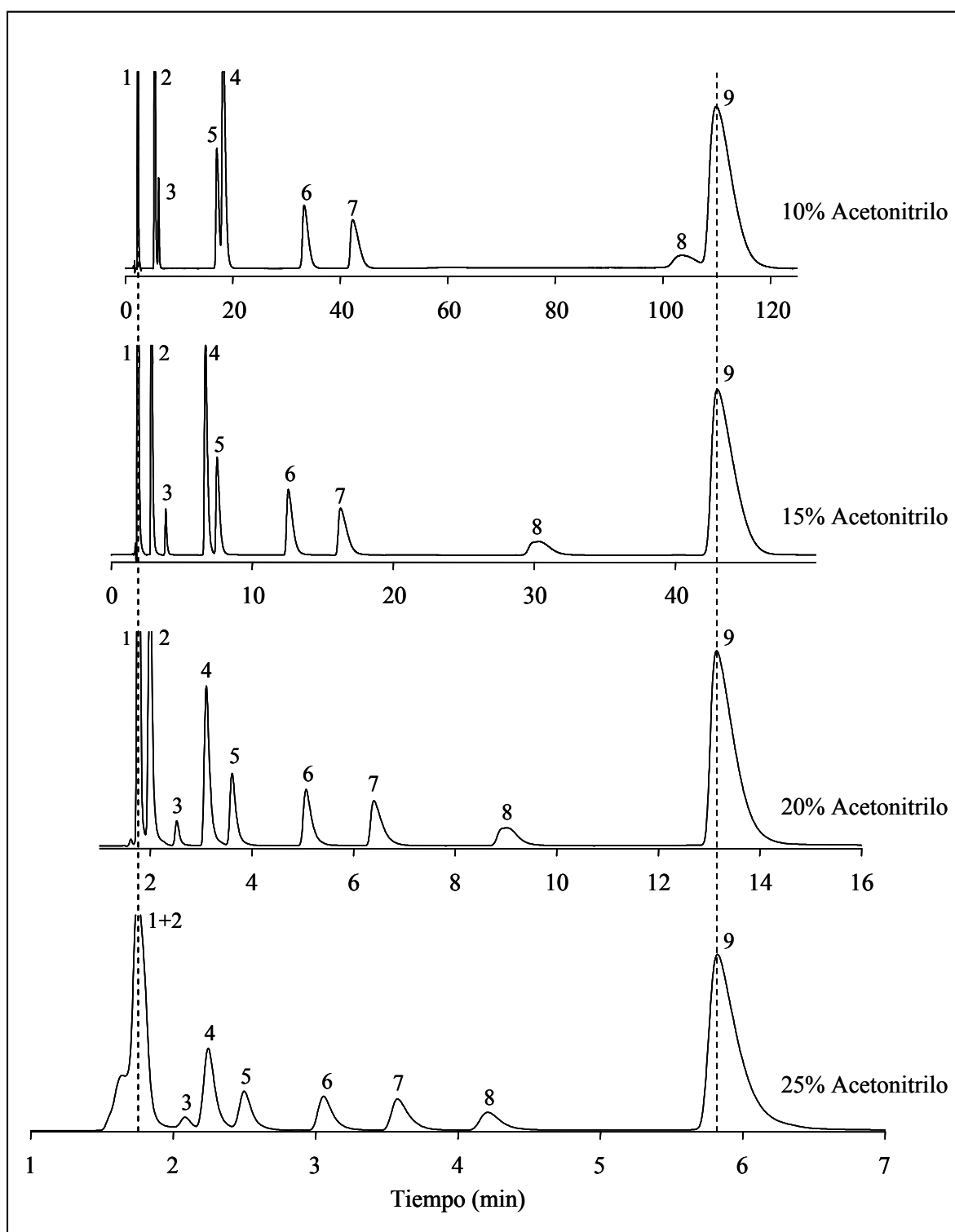
$$s_1 = 0.466 \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \quad (7.12)$$

Para evitar incrementos en la línea base fuera de la región del pico, lo que sería problemático en la predicción de cromatogramas y optimización de la resolución, se utilizó una función mixta PMG-exponencial, que se obtuvo reemplazando las regiones exteriores del pico por dos caídas exponenciales a ambos lados del pico PMG al 10% de la altura [41].

#### 7.4.4. Resolución

La Figura 7.5 muestra los cromatogramas para una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes (excluyendo de nuevo al timolol), eluidos a  $1 \text{ ml min}^{-1}$  a composiciones variables de la fase móvil. Como se puede apreciar, los compuestos aparecen resueltos en una región intermedia del contenido de disolvente orgánico. Para comprobar la resolución en el dominio experimental completo (acetonitrilo y flujo en los intervalos 10–25% y  $0.5\text{--}5 \text{ ml min}^{-1}$ , respectivamente), se aprovechó la posibilidad de describir con exactitud satisfactoria la retención y forma de los picos para diversas condiciones experimentales. Como medida de resolución se utilizó el concepto de pureza de pico, que es una medida intuitiva que cuantifica el porcentaje del área del pico libre de interferencias [42]:

$$p_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (7.13)$$



**Figura 7.5.** Cromatogramas experimentales para una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes eluidos a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , variando el contenido de acetonitrilo (ACN). En la Figura 7.2 aparece la identidad de los compuestos.

donde  $o_i$  es el área total del pico de interés y  $o_i'$  el área bajo el pico solapado por un cromatograma hipotético construido con los picos de los otros compuestos presentes en la mezcla. Las purezas de pico adoptan valores desde cero para el solapamiento total a la unidad para la resolución completa. La separación global en los cromatogramas se evaluó combinando las purezas elementales de la siguiente forma:

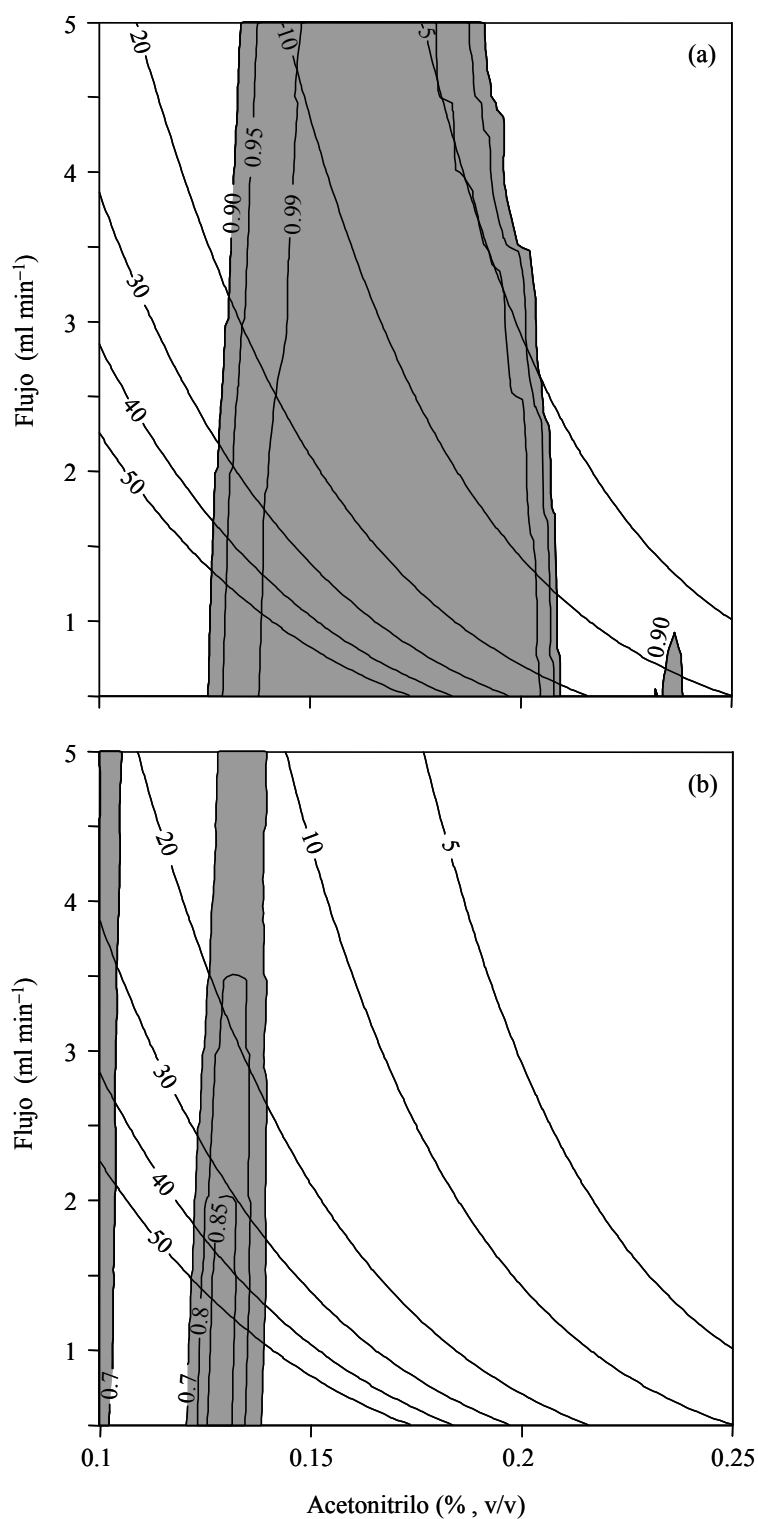
$$P = \prod_{i=1}^n p_i \quad (7.14)$$

donde  $n$  representa el número de picos [43].

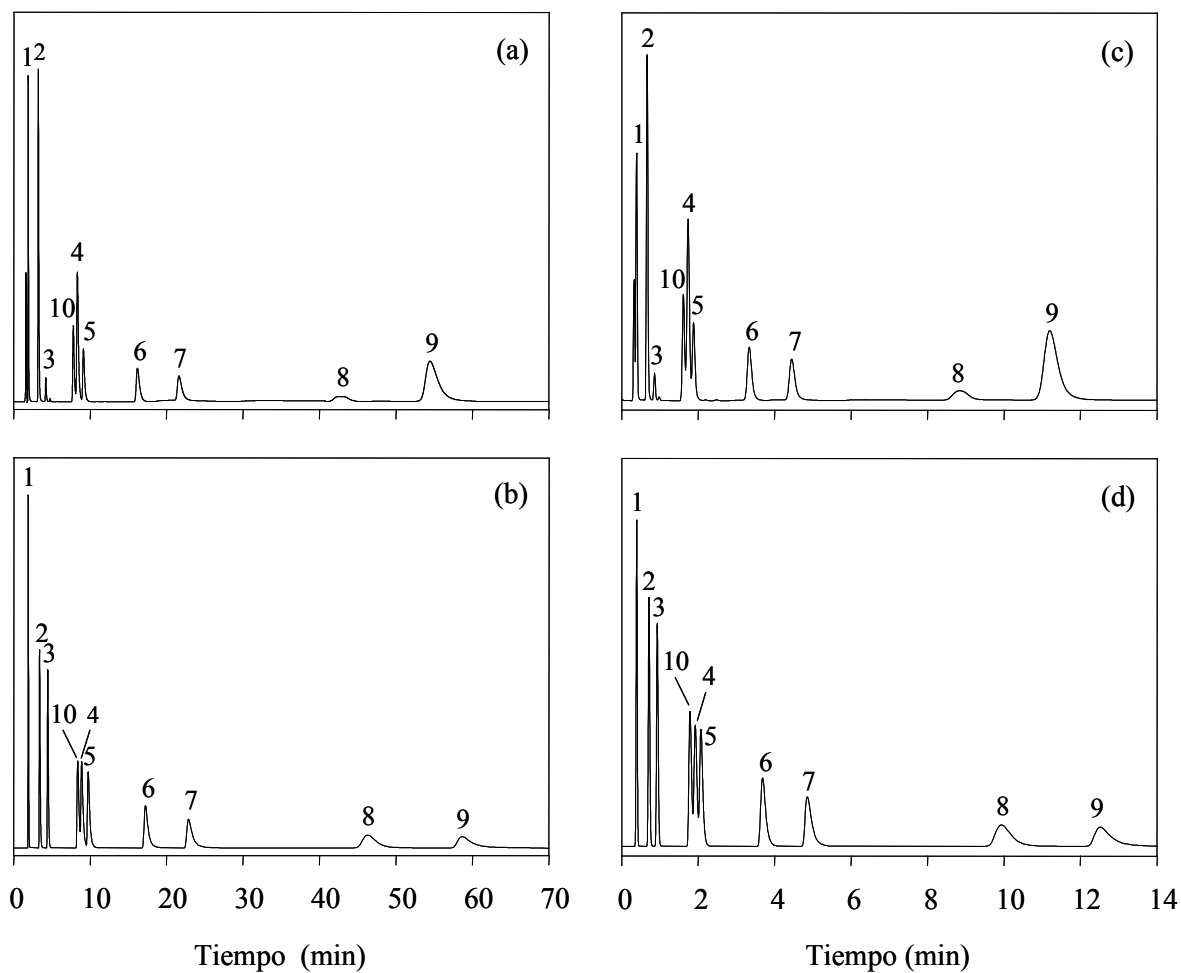
La Figura 7.6a muestra, para la columna Chromolith, un mapa de contorno indicando el grado de resolución para la mezcla de los nueve  $\beta$ -bloqueantes, a distintos contenidos de acetonitrilo y valores del flujo. El valor máximo de resolución ( $P_{\max} = 0.99$ ) corresponde a una amplia región central, que se estrecha al incrementarse el flujo debido al solapamiento de los dos compuestos menos retenidos. Este solapamiento progresivo se explica por el empeoramiento de las eficacias de los picos a flujos elevados (ya que los tiempos de retención disminuyen, aunque la distribución relativa de los picos no se vea alterada).

La Figura 7.6b muestra el mapa de contorno para la mezcla de diez  $\beta$ -bloqueantes (incluyendo ahora el timolol). Las estructuras en el mapa son de nuevo casi paralelas, con la región de mayor resolución en forma de flecha. Así, la resolución fue  $P > 0.85$  a  $F < 2 \text{ ml min}^{-1}$ , y  $P > 0.80$  a  $F < 3.5 \text{ ml min}^{-1}$ . En ambos diagramas, se han superpuesto isolíneas indicando el tiempo de análisis (min). De esta forma se obtiene una descripción completa (i.e. resolución y tiempo de análisis) del comportamiento de la columna Chromolith en todo el dominio experimental.

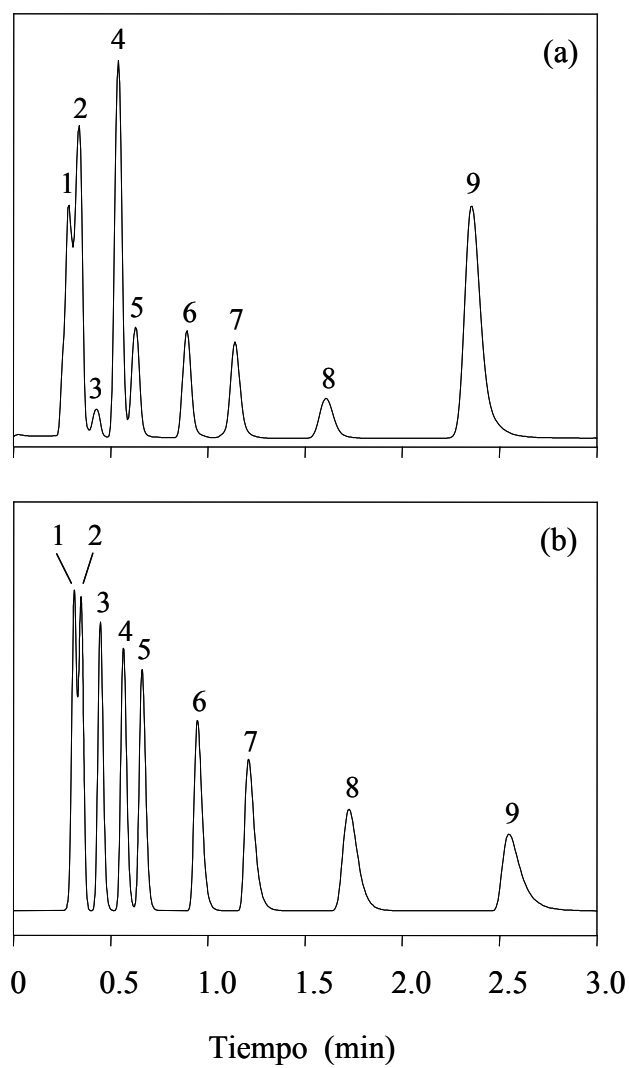
La exactitud de las predicciones se muestra en la Figura 7.7, donde se comparan los cromatogramas experimentales y predichos para los diez  $\beta$ -bloqueantes, eluidos con acetonitrilo al 13.3% y flujos de 1 y 5  $\text{ml min}^{-1}$ . Los cromatogramas predichos se obtuvieron de acuerdo a la Ecuación (7.6), considerando áreas normalizadas. Finalmente, la Figura 7.8 muestra los cromatogramas experimental y predicho para una condición extrapolada (acetonitrilo al 20% y 6  $\text{ml min}^{-1}$ , que se halla fuera del diseño experimental). Como se observa, la coincidencia es altamente satisfactoria.



**Figura 7.6.** Mapas de contorno indicando la pureza de pico para mezclas de: (a) nueve  $\beta$ -bloqueantes (sin el timolol), y (b) los diez  $\beta$ -bloqueantes, eluidos con fases móviles de acetonitrilo a flujo variable. Se han superpuesto las isolíneas que muestran el tiempo de análisis (min). Las regiones sombreadas corresponden a puridades de pico globales  $P > 0.9$  para (a), y  $P > 0.7$  para (b).



**Figura 7.7.** Cromatogramas experimentales (a,c) y predichos (b,d) obtenidos con una fase móvil de acetonitrilo al 13.3% y los flujos: (a,b) 1 ml min<sup>-1</sup>, y (c,d) 5 ml min<sup>-1</sup>. El pico 10 corresponde al timolol. La identidad de los otros  $\beta$ -bloqueantes se indica en la Figura 7.2. Se utilizó la Ecuación (7.6) para predecir los cromatogramas en (b,d).



**Figura 7.8.** Cromatogramas experimental (a) y predicho (b) obtenidos con una fase móvil de acetonitrilo al 20% y un flujo de  $6 \text{ ml min}^{-1}$ . La identidad de los compuestos se indica en la Figura 7.2. Se utilizó la Ecuación (7.6) para predecir los cromatogramas.

## 7.5. Conclusiones

La optimización interpretativa de las condiciones experimentales, considerando ambos factores composición de la fase móvil y flujo, puede llevarse a cabo de una manera similar a la de la optimización convencional de la composición de la fase móvil a un flujo fijo, utilizando la Ecuación (7.1) en combinación con la Ecuación (7.3). Además, en principio, los coeficientes del modelo obtenidos a partir de cromatogramas para composiciones variables de la fase móvil (al menos cuatro para asegurar una buena exactitud) y un flujo fijo pueden utilizarse para predecir la retención y el perfil de pico a cualquier otro flujo. Debería tenerse en cuenta que, para este propósito, se debe seleccionar un marcador del tiempo muerto que se ajuste a la Ecuación (7.4) con una ordenada en el origen nula.

La exactitud de las predicciones realizadas con la Ecuación (7.1) para los  $\beta$ -bloqueantes más retenidos no fue, sin embargo, totalmente satisfactoria. La corrección de las desviaciones observadas requirió la adición de otro término al modelo cuadrático clásico (Ecuación (7.6)), que correlaciona  $\log k$  con el flujo. La evaluación de los correspondientes coeficientes del modelo necesitaría, sin embargo, algunas medidas adicionales a otro valor de flujo. Con seis condiciones experimentales (a tres composiciones de fase móvil, cada una a dos flujos), se pueden obtener todos los coeficientes de la Ecuación (7.6) con suficiente exactitud. Otra posibilidad para desarrollar el modelo es efectuar una optimización a flujo bajo (utilizando los datos obtenidos con tres o cuatro composiciones de fase móvil), y llevar a cabo medidas adicionales utilizando la fase móvil óptima a otro flujo.

El flujo aplicado viene restringido por limitaciones instrumentales (i.e. bomba y detector), y el deterioro de las eficacias y, en consecuencia, la pérdida de resolución para los picos más críticos. La estrategia interpretativa descrita aquí, cuya fiabilidad se ha demostrado, ayudará al analista a seleccionar las mejores condiciones para los métodos desarrollados con columnas monolíticas, con un esfuerzo experimental mínimo. En cualquier caso, ofrecerá una descripción completa del comportamiento de la columna para la muestra analizada.



## 7.6. Referencias

1. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J. High. Resol. Chromatogr. 23 (2000) 93.
2. D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, C. Shaefer, D. Cunningham, LCGC 19 (2001) 1186.
3. N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, J. Chromatogr. A 965 (2002) 35.
4. A.M. Siouffi, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 801.
5. F. Svec, C.G. Huber, Anal. Chem. 78 (2006) 2100.
6. B.A. Olsen, B. C. Castle, D.P. Myers, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 796.
7. V. Pretorius, J.C. Davidtz, D.H. Desty, J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 2 (1979) 583.
8. K. Nakanishi, N. Soga, Inorganic Porous Column, Japan patent 5-200,392 (1993).
9. D. Lubda, E. Muller, Method for Producing Monolithic Chromatography Columns, US patent application 2003/0155676 a1 (2003).
10. K. Nakanishi, N. Soga, H. Minakuchi, Capillary Column Including Porous Silica Gel Having Continuous Throughpores and Mesopores, US patent 6,531,060 (2003).
11. K. Nakanishi, N. Soga, J. Am. Ceram. Soc. 74 (1991) 2518.
12. K. Nakanishi, N. Soga, J. Non-Cryst. Solids 139 (1992) 1
13. K. Nakanishi, N. Soga, J. Non-Cryst. Solids 139 (1992) 14.
14. H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Anal. Chem. 68 (1996) 3498.
15. K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, J. Sol-Gel Sci. Technol. 13 (1998) 163.
16. H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, J. Chromatogr. A 954 (2002) 5.
17. H. Tanaka, N. Ishizuka, K. Hosoya, K. Kimata, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, Kuromatogurafi 14 (1993) 50.
18. K. Cabrera, J. Sep. Sci. 27 (2004) 843.
19. A.M. Siouffi, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 86.
20. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, J. Chromatogr. A 1036 (2004) 127.

21. K. Mistry, N. Grinberg, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 28 (2005) 1055.
22. N. Wu, J. Dempsey, P.M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvratt, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 149.
23. F. Svec, L. Geiser, LCGC 24 (2006) 22.
24. A.M. van Nederkassel, A. Aerts, A. Dierick, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) 233.
25. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta, 579 (2006) 125.
26. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1193 (2008) 117.
27. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, J Chromatogr 282 (1983) 107.
28. J.R. Torres Lapasió, M. Rosés, E. Bosch, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 886 (2000) 31.
29. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 51.
30. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A, 1163 (2007) 49.
31. U.D. Neue, HPLC columns: Theory, Technology and Practice, Wiley, New York, 1997.
32. L. Kaminski, S. El Deeb, H. Wätzig, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1745.
33. M. Hermann, H. Christensen, J.L.E. Reubsæet, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 1263.
34. Y. Ping. Zhang, Y.J. Zhang, W.J. Gong, A.I. Gopalan, K.P. Lee, J. Chromatogr. A 1098 (2005) 183]
35. Y.C. Guillaume, E. Peyrin, Talanta 51 (2000) 579.
36. T. Sivakumar, R. Manavalan, C. Muralidharan, K. Valliappan, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 1842.
37. D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 965 (2002) 51.
38. J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 57 (1983) 730.
39. J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A, 1022 (2004) 17.
40. J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, Anal. Chem. 69 (1997) 3822.

41. G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 146.
42. S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 187.
43. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 61.



## Capítulo 8

### **Comportamiento de una columna Chromolith RP-18e en comparación con columnas de micropartículas para el análisis de $\beta$ -bloqueantes**

#### **8.1. Resumen**

Se muestra un estudio en el que se compara exhaustivamente el comportamiento cromatográfico de una columna monolítica (Chromolith RP-18e) en la separación isocrática de diez  $\beta$ -bloqueantes con fases móviles de acetonitrilo-agua, frente al de tres columnas de micropartículas de fase inversa fabricadas con distintos tipos de sílice: Spherisorb ODS-2 (sílice tipo A), Kromasil C18 (tipo B) y XTerra MS C18 (tipo B combinada con metilsilano). Se consideró el tiempo de análisis, la selectividad, la posibilidad de transferencia de los resultados entre columnas, el perfil del pico (su eficacia y asimetría) y la resolución, extendiéndose el estudio a un amplio intervalo de composiciones de fase móvil. La columna Chromolith mostró un buen comportamiento para el análisis de  $\beta$ -bloqueantes respecto a las columnas empacadas. En términos de tiempo de análisis y selectividad, la mayor similitud se encontró entre las columnas Chromolith y XTerra, mientras que la Spherisorb mostró una pauta de fuerza eluyente similar a la Chromolith. Además, la adición de un agente bloqueante de los grupos silanol libres (0.1% de trietilamina) a ambas columnas Chromolith y Spherisorb, proporcionó, aparentemente, un grado de recubrimiento similar para los grupos silanol, ya que se obtienen tiempos de análisis y perfiles de pico similares. Además, las selectividades fueron similares.

## 8.2. Introducción

La necesidad de realizar análisis de calidad en tiempos cortos posee una importancia relevante en la industria farmacéutica, en la que el número de muestras a analizar se incrementa continuamente [1–4]. En el desarrollo de nuevos fármacos, deben examinarse un gran número de compuestos y de productos finales para evaluar su pureza. Muchas empresas farmacéuticas utilizan química combinatoria en la búsqueda de fármacos más efectivos. El resultado es la síntesis de miles de nuevos compuestos, que deben ser analizados rápidamente. Por otro lado, la disminución del tiempo de análisis beneficia el control de los procesos de fabricación (i.e. comprobación de la cuantitatividad de una reacción o análisis de los sub-productos generados) y de la calidad de un lote antes de salir al mercado.

Para realizar estos análisis, se emplea con frecuencia la cromatografía líquida de fase inversa (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC). Sin embargo, la exploración de un número tan elevado de muestras utilizando métodos estándar (con tiempos de análisis de 15 a 20 min) supone un tiempo total excesivo. De ahí el interés en cualquier mejora en la técnica que disminuya drásticamente los tiempos de separación, ya que esto implicaría una mayor capacidad de procesamiento de muestras, y como resultado, un menor coste. Asimismo, las columnas deberían ser altamente robustas para operar 24 horas al día. Por todo ello, en la última década, las separaciones rápidas en RPLC han constituido un campo de extensa investigación.

Los límites para la cromatografía rápida vienen fijados por la limitación en la presión soportada por los sistemas cromatográficos disponibles comercialmente (generalmente, 400 bares). Pero incluso si se superara este inconveniente, a las altas presiones asociadas a los flujos elevados, las columnas convencionales empacadas con micropartículas resultarían dañadas [5]. Existen diversas propuestas para hacer frente a esta limitación: el uso de columnas de micropartículas cortas a flujos elevados [6–8], empaquetamientos especiales con retención reducida [9], temperaturas elevadas [10], columnas con tamaño de partícula reducido que son sometidas a presiones elevadas [11], y columnas monolíticas de base sílice [2,12,13]. Sin embargo, la eficacia y la resolución se ven considerablemente comprometidas con las columnas de micropartículas más cortas, y las temperaturas o presiones elevadas requieren un equipo cromatográfico especial. En contraste, las columnas monolíticas pueden utilizarse con equipos convencionales, y

soportar flujos elevados con una sobrepresión menor, lo que extiende el tiempo de vida de la columna. Por otro lado, la pérdida de eficacia al aumentar el flujo es menor que para las columnas convencionales de micropartículas [14–16]. Es necesario resaltar que cuando se opera a flujos elevados, el consumo total de disolvente por análisis es comparable al utilizado en los métodos convencionales a flujos bajos. Por lo tanto, la ventaja se halla sólo asociada a la disminución del tiempo de análisis.

Una columna monolítica de base sílice consiste en un cilindro preparado dentro de un molde mediante la polimerización de tetrametoxisilano de elevada pureza (libre de impurezas metálicas), en presencia de polietilenglicol que actúa como generador de poros [17]. Tras un periodo de envejecimiento y tratamiento a temperatura elevada, el cilindro se extrae del molde, se reviste con un tubo PEEK [18], y se le provee de las cadenas químicas necesarias para las separaciones en RPLC, seguido de un proceso de protección de los grupos silanol libres [19]. Estas columnas salieron al mercado, en primer lugar, como un producto de la casa Merck KGaA (Darmstadt, Alemania), bajo la marca Chromolith [1]. Más tarde, Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU) empezó a comercializar las columnas Onyx con la licencia de Merck KGaA. Las columnas Chromolith RP-18e con un diámetro interno de 4.6 mm disponibles en el mercado son las siguientes (longitud de la columna): Chromolith Flash (25 mm), Chromolith SpeedROD (50 mm), y Chromolith Performance (100 mm).

La elevada porosidad de los cilindros de monolito de sílice proporcionan una combinación única de macroporos ( $\sim 2.2 \mu\text{m}$ ) y mesoporos ( $\sim 13 \text{ nm}$ ) [20]. Los macroporos permiten la aplicación de flujos elevados con una presión baja, mientras que los mesoporos proporcionan una gran superficie uniforme sobre la que tiene lugar la adsorción de los solutos, dando lugar a la separación en RPLC. Debido a sus características, las columnas monolíticas de base sílice son un campo de investigación continua en RPLC. La aparición de estas fases estacionarias en el mercado ha favorecido el desarrollo de aplicaciones analíticas que implican principalmente compuestos farmacéuticos y medio-ambientales [16].

Sin embargo, el uso práctico de las columnas monolíticas de base sílice en RPLC no ha sido tan extenso como se esperaba, a pesar de todas sus ventajas. Para entender completamente su comportamiento, es necesaria la adquisición sistemática de muchas series de datos experimentales fiables en un amplio intervalo de condiciones

cromatográficas, y realizar el análisis e interpretación consistente de los resultados desde diferentes puntos de vista [21].

Con el propósito de caracterizar las columnas monolíticas de base sílice, muchos autores las han comparado con columnas de micropartículas. La mayoría de los autores han llegado a la conclusión de que las columnas son comparables respecto a su selectividad y reproducibilidad [22–33], pero las columnas monolíticas parecen ser más estables que las empacadas, debido a la estructura rígida de sílice [20]. Algunos resultados procedentes de estudios comparativos se detallan en la Tabla 8.1.

En este trabajo, se compara la columna Chromolith Performance RP-18e, en términos de fuerza eluyente, selectividad, posibilidad de transferencia de los resultados entre columnas, perfil del pico y capacidad de resolución, con tres columnas de micropartículas (Spherisorb ODS-2, Kromasil C18 y XTerra MS C18), en la separación de diez  $\beta$ -bloqueantes de diversa polaridad con fases móviles de acetonitrilo-agua en un amplio intervalo de composiciones. Los  $\beta$ -bloqueantes son compuestos básicos de interés farmacológico, que permiten estimar los silanoles residuales en las columnas.

### **8.3. Parte experimental**

#### **8.3.1. Reactivos**

Se examinó el comportamiento cromatográfico de los siguientes  $\beta$ -bloqueantes: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid), atenolol, pindolol, propranolol, timolol (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona), esmolol (Du Pont-De Nemours, Le Grand Saconnex, Suiza)), labetalol (Glaxo, Tres Cantos, Madrid), metoprolol, y oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona). Las fases móviles se prepararon con acetonitrilo (Scharlab, Barcelona). El pH se tamponó a 3.0 con hidrógenofosfato disódico 0.01 M y adición de HCl (Panreac, Barcelona). Ocasionalmente se añadió 0.1% de trietilamina (TEA) (Fluka, Bruschi, Suiza) a las mezclas acetonitrilo-agua.



**Tabla 8.1.** Estudios en los que se comparan columnas Chromolith con columnas de micropartículas.

Chromolith	Otras columnas	Compuestos	Detalles	Ref.
Prototipos de columnas de cilindros de sílice de Merck (100 × 4.6 mm)	Purospher RP-18e (5 µm, 125 × 4 mm, Merck)	Uracilo, tolueno, etilbenceno, <i>n</i> -propilbenceno, <i>n</i> -butilbenceno, <i>n</i> -pentilbenceno	Comparación de gráficos de altura del plato teórico ( <i>H</i> ), permeabilidad y sobrepresión de la columna frente al flujo. Fase móvil: 73:27 acetonitrilo-agua Flujo: 0.2–6 ml min <sup>-1</sup> (columnas monolíticas) 0.5–3 ml min <sup>-1</sup> (Purospher)	22
SpeedROD RP-18e (50 × 4.6 mm)	Superspher 100 RP-18 (125 × 3 mm, Merck)	Ocratoxina A	Comparación del orden de elución y selectividad. Fase móvil: 68.5:29:2.5 metanol-agua-ácido acético.	23
Columnas de cilindros de sílice (100 × 4.6 y 50 × 4.6 mm)	LiChroCART Purospher RP-18e (5 µm, 125 × 4 mm, Merck) LiChroCART Purospher STAR 18e (3 µm, 55 × 4 mm, Merck)	Butilbenceno, <i>o</i> -terfenil, amilbenceno, trifenileno	Comparación del orden de elución y selectividad. Fase móvil: 80:20 metanol-agua	18
SpeedROD RP-18e	Zorbax SB-C18 (5 µm, 50 × 2.1 mm, Agilent) Zorbax RX-C8 (5 µm, 150 × 2.1 mm, Agilent)	Metabolitos de la Debrisoquina	Acoplamiento con espectrometría de masas. Comparación de tiempos de retención, anchuras de pico, resolución y selectividad. Fase móvil: 0–25% acetonitrilo	24
Performance RP-18e (100 × 4.6 mm)	LiChrospher 100 RP-18e (5 µm, 125 × 4.6 mm, Merck) RP-Amide C16 (150 × 2.1 mm, Supelco)	Microcistinas y nodularin-R	Comparación de los tiempos de retención, resolución y selectividad. Fase móvil: gradientes TFA-acetonitrilo. Flujo: 2–4 ml min <sup>-1</sup> (columna monolítica), 1.0–1.5 ml min <sup>-1</sup> (LiChrospher) y 0.3 ml min <sup>-1</sup> (RP-Amide)	25

Tabla 8.1 (continuación).

Chromolith	Otras columnas	Compuestos	Detalles	Ref.
Performance RP-18e	Hypersyl (250 × 4.6 mm) Kromasil (250 × 4.6 mm) Phenomenex Luna (150 × 4.6 mm) Symmetry (150 × 3.9 mm, Waters) Vydac (250 × 4.6 mm)	Fenol y cafeína	Medida de las isotermas de adsorción de los solutos. Fase móvil: 30:70 metanol-agua Flujo: 1 ml/min	26
Performance RP-18e, RP-8e y RP-4e	LiChrospher RP-18e (Merck) Zorbax SB300-C18 (Agilent) PurospherSTAR RP-18e (3 µm, 55 × 4.0 mm) (Merck)	Cafeína, acetona, angiotensina II, insulina y albúmina de suero bovino	Comparación de la caída de presión, eficacia y capacidad de adsorción. Fase móvil: 50:50 acetonitrilo-agua Flujo: 0.1–2.5 ml/min	27
SpeedROD RP-18e	Symmetry (3.5 µm, 50 × 4.6 mm, Waters) Phenomenex Luna (5 µm 50 × 4.6 mm) XTerra (3 µm, 50 × 3.0 mm, Waters) Optimize velocity (3 µm, 50 × 4.6 mm) Varian Chrompack (3 µm, 50 × 4.6 mm)	Benzamida, <i>N</i> -metilbenzamida, bifenilo, acetofenona, alcohol bencílico, etilparaben, propilparaben	Comparación de la selectividad, tiempo de re-equilibrado y precisión. Fase móvil: gradientes de acetonitrilo-agua Flujo: 1 a 9 ml/min para la SpeedROD	28
SpeedROD RP-18e y Performance RP-18e	LiChrospher 100 RP-18e (250 × 4.6 mm, Merck) Alltima C8 LiChroCART Purospher RP-18e (125 × 4 mm, Merck)	Nimesulida, tetraciclina, eritromicina y fenoximetilpenicilina	Transferencia de métodos de separación a columnas monolíticas. Fase móvil: mezclas acetonitrilo-agua y metanol-agua Flujo: 1–9 ml/min para las columnas	29

Tabla 8.1 (continuación).

Chromolith	Otras columnas	Compuestos	Detalles	Ref.
Performance RP-18e	17 columnas convencionales de micropartículas	58 compuestos neutros	Observación de las propiedades de retención similares utilizando el modelo de parámetros de solvatación.	30
Performance RP-18e y SpeedROD RP-18e	YMC C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm y 3 µm, 150 × 4.6 mm, Waters) Zorbax C18 (3.5 µm, 250 × 4.6 mm, Agilent)	Fenol, alquilbencenos (CnH2n+1C6H5, $n = 0-7$ ) y <i>N,N</i> -dimetilanilina	Comparación de la caída de presión, selectividad y asimetría. Fase móvil: mezclas acetonitrilo-agua Flujo: 1.5 ml/min	2
Performance RP-18e, SpeedROD RP-18e y Flash RP-18e (25 × 4.6 mm)	Discovery (5 µm, 250 × 3 mm, Supelco)	Metil-, etil- y propilparaben, ketoprofen, estradiol, hidrocortisona y estrona	Comparación de la resolución, tiempo de retención, eficacia y anchura de pico. Fase móvil: mezclas acetonitrilo-agua Flujo: 1–5 ml/min	31
Performance RP-18e	YMC ODS (150 × 3 mm) LiChrospher 100 RP-18 (5 µm, 250 × 4 mm) Symmetry RP-18 (3.5 µm, 150 × 3 mm)	Metil-, etil-, propil- y butilparaben	Comparación de la resolución, tiempo de retención, eficacia y anchura de pico. Fase móvil: gradientes acetonitrilo-agua Flujo: 1–3 ml/min (columna monolítica), 1 ml/min (columnas de micropartículas)	5
Performance RP-18e	Luna ODS (5 µm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex) Purospher RP-18 (5 µm, 250 × 4.6 mm, Merck) Synergi RP-MAX C12 (4 µm, 250 × 4.6 mm, Merck)	11 fenoles	Comparación de los gráficos de van Deemter y de las asimetrías Fase móviles: mezclas acetonitrilo-agua Flujo: 0.5–1 ml/min (columnas de micropartículas) y 1–4 ml/min (columna monolítica)	32
Performance RP-18e	Pecosphere C18 (5 µm, 150 × 4.6 mm, Perkin Elmer)	Vitaminas A y E	Comparación de la retención y presión Fase móvil: 100% metanol	33

### **8.3.2. Instrumentación y columnas**

El sistema de HPLC estaba equipado con una bomba isocrática (Agilent Serie 1200, Waldbronn, Alemania), un muestreador automático y un detector UV-visible (Serie 1100). La longitud de onda de medida fue 225 nm, excepto para el timolol para el que se utilizó 300 nm. El período de muestreo fue de 400 ms. Se realizaron inyecciones por triplicado con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$  y un flujo de 1  $\text{ml min}^{-1}$ . La adquisición de los datos se llevó a cabo con una estación de datos de Agilent (HPChemStation), y el tratamiento matemático se realizó con MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, EE.UU.).

Se utilizaron cuatro columnas de distinta naturaleza (Tabla 8.2), cada una de ellas conectada a una precolumna de características similares: Chromolith Performance RP-18e (Merck), Spherisorb ODS-2 (Scharlab), Kromasil C18 (Análisis Vínicos, Ciudad Real), y XTerra MS C18 (Waters, MA, EE.UU.). Los valores de tiempo muerto ( $t_0$ ), medidos con uracilo (Acros, Organics, Geel, Bélgica) como marcador fueron: Chromolith ( $t_0 = 1.58$  min), Spherisorb (1.27 min), Kromasil (1.57 min) y XTerra (1.65 min).

## **8.4. Resultados y discusión**

### **8.4.1. Columnas y compuestos de prueba**

Se comparó el comportamiento de la columna Chromolith RP-18e en la separación de  $\beta$ -bloqueantes respecto a tres columnas empacadas de diferentes tipos: Spherisorb ODS-2, Kromasil C18 y XTerra MS C18. Estas columnas se fabrican con materiales de base sílice que pertenecen a la misma categoría (USP L1) [35], lo que significa que contienen octadecilsilano enlazado químicamente a sílice porosa, con micropartículas con un diámetro en el intervalo 3–10  $\mu\text{m}$ . A pesar de que la tecnología utilizada para preparar columnas monolíticas de base sílice es distinta a la de las columnas convencionales de partículas, el material de relleno posee características similares [30]. La Tabla 8.2 compara las propiedades fisico-químicas de las cuatro columnas.

**Tabla 8.2.** Propiedades físico-químicas de las cuatro columnas utilizadas.

	Chromolith RP-18e <sup>a</sup>	Spherisorb ODS-2 <sup>b</sup>	Kromasil C18 <sup>c</sup>	XTerra MS C18 <sup>c</sup>
Tamaño de partícula (μm)	–	5	5	5
Tamaño de los mesoporos (Å)	130	80	100	120
Tamaño de los macroporos (μm)	2	–	–	–
Área superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	300	220	340	175
Carbono total (% en peso)	19.5	12	20	15
Recubrimiento de la superficie (μmol m <sup>-2</sup> )	3.6	2.8	3.6	2.4
Protección de los silanoles libres	Sí	Sí	Sí	Sí
Dimensiones (mm × mm)	100 × 4.6	125 × 4.6	150 × 4.6	150 × 4.6
Porosidad total	> 0.80	–	0.59	0.62
Intervalo de pH	2.0–7.5	3.0–7.5	2.0–9.0	1.0–12.0

<sup>a</sup> Ref. [21]. <sup>b</sup> [www.analyticalcolumns.com](http://www.analyticalcolumns.com). <sup>c</sup> Ref. [34].

La columna Spherisorb ODS-2 es, quizás, la columna de RPLC más ampliamente citada en la bibliografía científica, proporcionando una gama enorme de métodos validados y de aplicaciones. Las Kromasil suponen un avance posterior en la tecnología de columnas, y son muy populares en las industrias farmacéutica y biocientífica, ya que la estabilidad de su empaquetamiento se extiende hasta pH 9. Las XTerra corresponden a un desarrollo más reciente en el campo de las fases estacionarias de base sílice, e incorporan partículas híbridas, combinación de sílice y componentes orgánicos (metilsilano), que facilitan la estabilidad hasta pH 12.

Las columnas Spherisorb pertenecen a un diseño más antiguo y contienen sílice de tipo A (de acuerdo a la clasificación propuesta por Kirkland [36]). Las columnas Kromasil, Chromolith y XTerra contienen sílice de tipo B de pureza elevada [37], que apareció hace aproximadamente 20 años como resultado de la mejora en los procesos de fabricación de columnas. La sílice de tipo B permite un aumento del recubrimiento promedio de la superficie ( $3.2 \pm 0.7 \mu\text{mol m}^{-2}$  frente a  $2.5 \pm 0.7 \mu\text{mol m}^{-2}$  para las columnas C18 de tipo A) [38]. Las columnas XTerra son fases de tipo B atípicas, con un menor recubrimiento de fase enlazada ( $2.4 \mu\text{mol m}^{-2}$ ). Las columnas de tipo A son más ácidas que las de tipo B, debido a la presencia de silanoles aislados en la matriz de sílice y a la contaminación por metales (e.g. Fe y Al) [39].

Los  $\beta$ -bloqueantes son fármacos que se administran para el tratamiento de la tensión elevada y en problemas cardiovasculares, neurológicos y neuropsiquiátricos [40]. Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos para controlarlos en muestras fisiológicas. Estos fármacos se han utilizado también como compuestos de prueba para investigar diferentes tipos de columnas, incluyendo las Chromolith, debido a su naturaleza básica. Así, se ha publicado un estudio sobre la separación de una mezcla de prueba de cinco  $\beta$ -bloqueantes (atenolol, pindolol, metoprolol, celiprolol y bisoprolol) para mostrar el comportamiento de una Chromolith SpeedROD RP-18e a flujos elevados de hasta  $9 \text{ ml min}^{-1}$ , donde los cinco componentes fueron eluidos en menos de 1 min [1,18]. También se demostró la aplicación ventajosa de gradientes de flujo con una Chromolith Performance RP-18e, cromatografiando una mezcla de prueba de nueve  $\beta$ -bloqueantes (pindolol, nadolol, pafenolol, metoprolol, celiprolol, carazolol, bisoprolol, alprenolol y propranolol) [18].

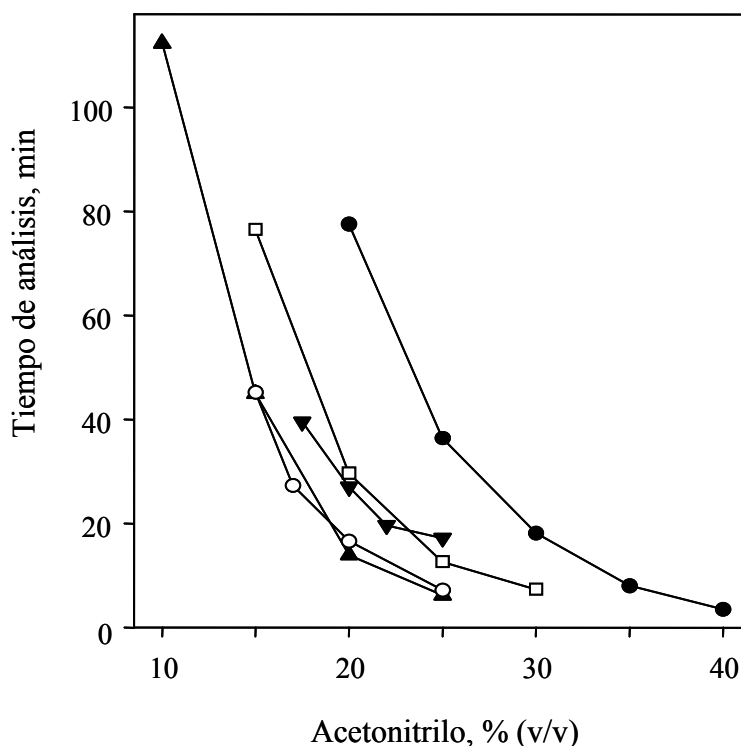
A continuación, se muestran los resultados de un estudio comparativo de las cuatro columnas (Chromolith Performance RP-18e, Spherisorb ODS-2, Kromasil C18, y XTerra MS C18), utilizadas para separar diez  $\beta$ -bloqueantes (acebutolol, atenolol, carteolol, esmolol, labetalol, metoprolol, oxprenolol, pindolol, propranolol y timolol), la mayoría con una polaridad intermedia (logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua,  $\log P_{o/w}$  entre 1.2 y 2.6) [41]. Las comparaciones se realizaron a un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que las columnas monolíticas permiten el uso de flujos elevados dentro de los límites de presión operativos de un cromatógrafo convencional, lo que implica una disminución en el tiempo de análisis. La selectividad no varía al aumentar el flujo. Sin embargo, la separación de los picos es más perfecta a flujos bajos (del orden de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ), ya que la resolución de los picos próximos puede verse comprometida debido al aumento relativo de la anchura de los picos al incrementar el flujo (véase Capítulo 7).

#### **8.4.2. Modelización de la retención**

Se eluyeron los  $\beta$ -bloqueantes con fases móviles de acetonitrilo-agua a diversas composiciones de fase móvil: 10, 15, 20 y 25% de acetonitrilo (v/v) para la columna Chromolith; 20, 25, 30, 35 y 40% de acetonitrilo para la Spherisorb; 15, 20, 25 y 30% de acetonitrilo para la Kromasil; y 15, 17, 20 y 25% de acetonitrilo para la XTerra. Los intervalos de contenido de disolvente orgánico ensayados con las diferentes columnas coincidieron sólo parcialmente, ya que se seleccionaron para conseguir suficiente retención para el compuesto menos retenido, y una retención no excesiva para el compuesto más retenido en cada columna. Por lo tanto, los tiempos de retención mayores (i.e. la menor fuerza eluyente) alcanzada para la columna Spherisorb, a la misma composición de fase móvil, forzó el uso de contenidos de acetonitrilo mayores. Este comportamiento se ilustra en la Figura 8.1, donde se representa el tiempo de análisis (i.e. tiempo de retención del compuesto más retenido) frente al contenido de disolvente orgánico.

Varios autores han observado tiempos de retención menores con las Chromolith, en comparación con otras columnas con la misma área superficial y dimensiones similares [2,18]. En principio, esto significa que se necesita una menor concentración de disolvente

orgánico para lograr factores de retención similares. Se ha explicado la menor retención de las Chromolith como consecuencia de su elevada porosidad y baja densidad. Ello se traduce en un área superficial por unidad de volumen menor [2]. Sin embargo, la Figura 8.1 muestra que para los  $\beta$ -bloqueantes, el tiempo de análisis de la columna Chromolith es similar al obtenido para la columna XTerra.



**Figura 8.1.** Tiempo de análisis frente a la composición de la fase móvil para las diferentes columnas: Chromolith (▲), XTerra (○), Spherisorb en presencia de TEA (▼), Kromasil (□) y Spherisorb (●).

A fin de realizar un examen exhaustivo de la capacidad de retención de las cuatro columnas en el análisis de los  $\beta$ -bloqueantes, se modelizó el comportamiento de cada compuesto (medido como logaritmo del factor de retención,  $\log k$ ) frente a la fracción volumétrica de disolvente orgánico en la fase móvil acuo-orgánica,  $\varphi$ , utilizando la relación cuadrática clásica:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (8.1)$$



donde  $c_0$ ,  $c_1$ , y  $c_{11}$  son coeficientes de regresión con valores característicos para un soluto y sistema columna/disolvente determinados.

De acuerdo a la Figura 8.2, la exactitud de las predicciones proporcionadas por la Ecuación (8.1), para los  $\beta$ -bloqueantes cromatografiados con las cuatro columnas, es satisfactoria. Los modelos de retención obtenidos en cada caso se utilizaron para simular cromatogramas a diferentes composiciones de fase móvil y predecir la resolución para cada columna.

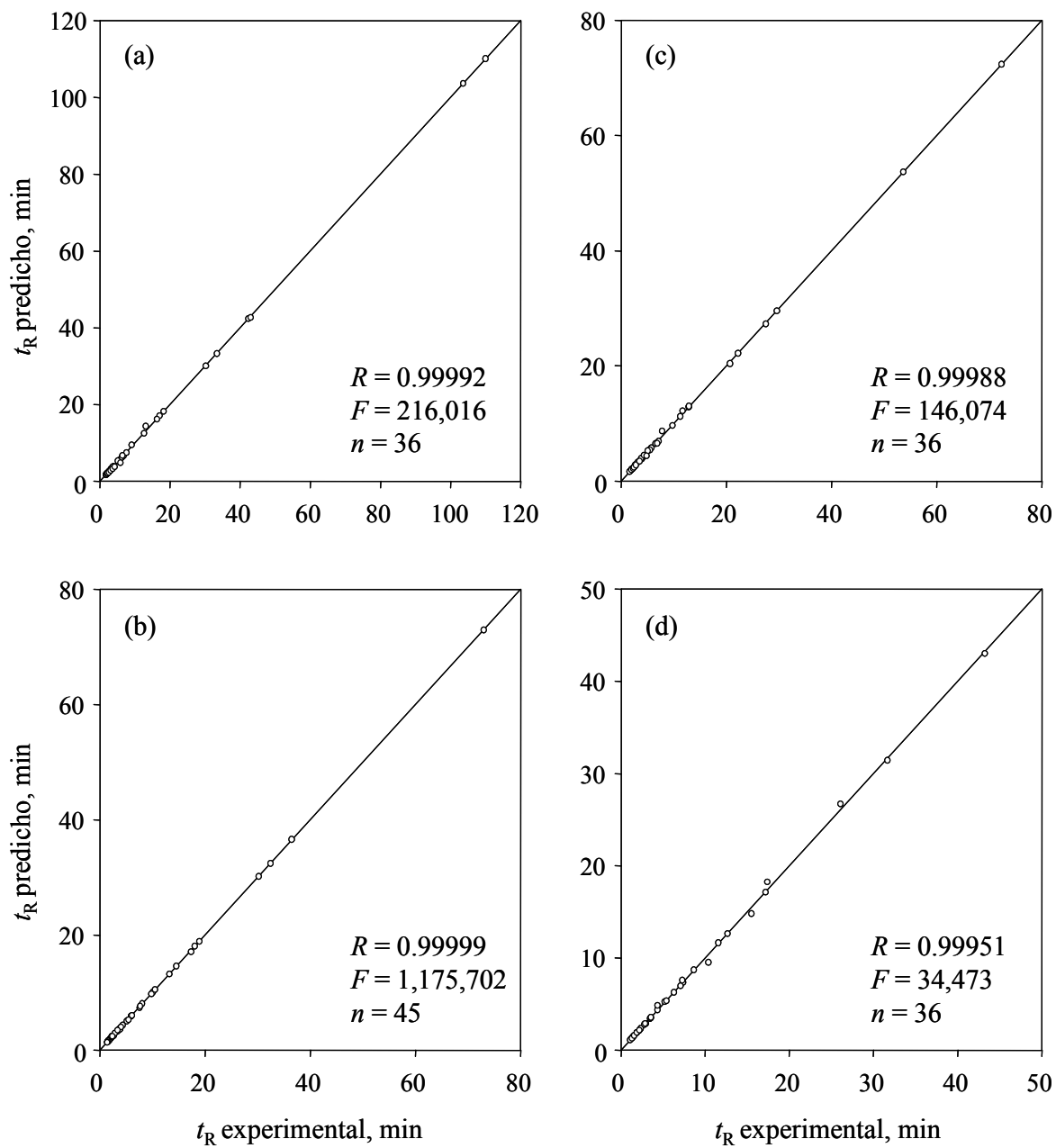
### 8.4.3. Selectividad

Los mecanismos de separación, y en consecuencia, la selectividad para una determinada columna, vienen determinados por su química superficial (superficie enlazada y protección de los grupos silanol). Por consiguiente, varios autores han comentado las similitudes entre las columnas Chromolith y diversas columnas C18 empacadas (ver Tabla 8.1) [2,16,18]. En estos estudios, a menudo se comparan los valores de selectividad ( $\alpha$ ) para pares de picos seleccionados [28,30]:

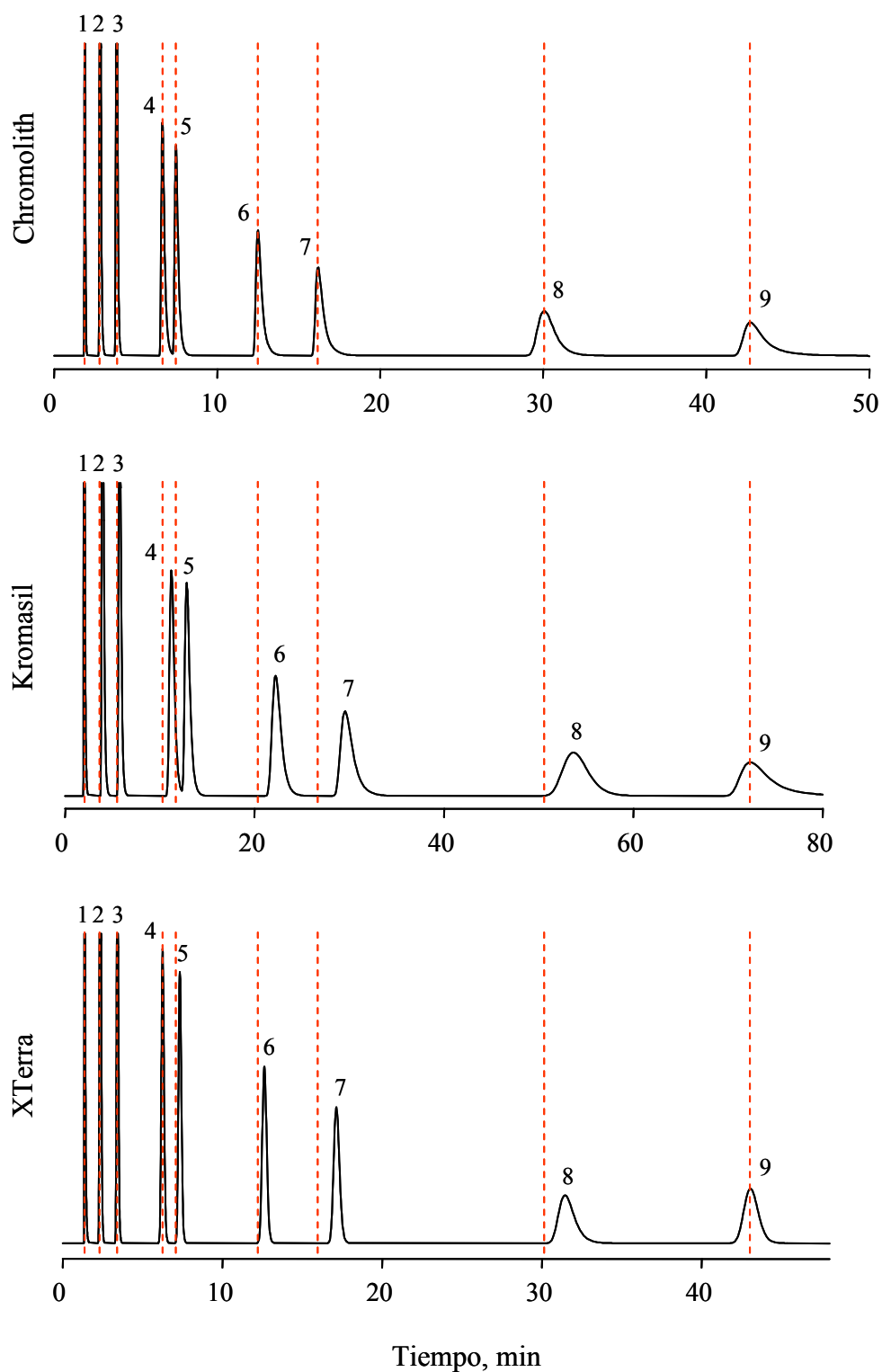
$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (8.2)$$

donde  $k_1 > k_2$ . Estas comparaciones no son exhaustivas, ya que se realizan generalmente a una composición de fase móvil única (como máximo, a unas pocas composiciones de fase móvil), encontrando diverso nivel de correlación para pares de picos distintos. En dos de estos estudios, se observó una elevada similitud entre la Chromolith SpeedROD RP-18e y una columna XTerra, para una mezcla de prueba de siete compuestos con un intervalo amplio de polaridades [28], y entre las columnas Chromolith Performance RP-18e y LiChrospher 100 RP-18 para un grupo de 17 compuestos aromáticos [30].

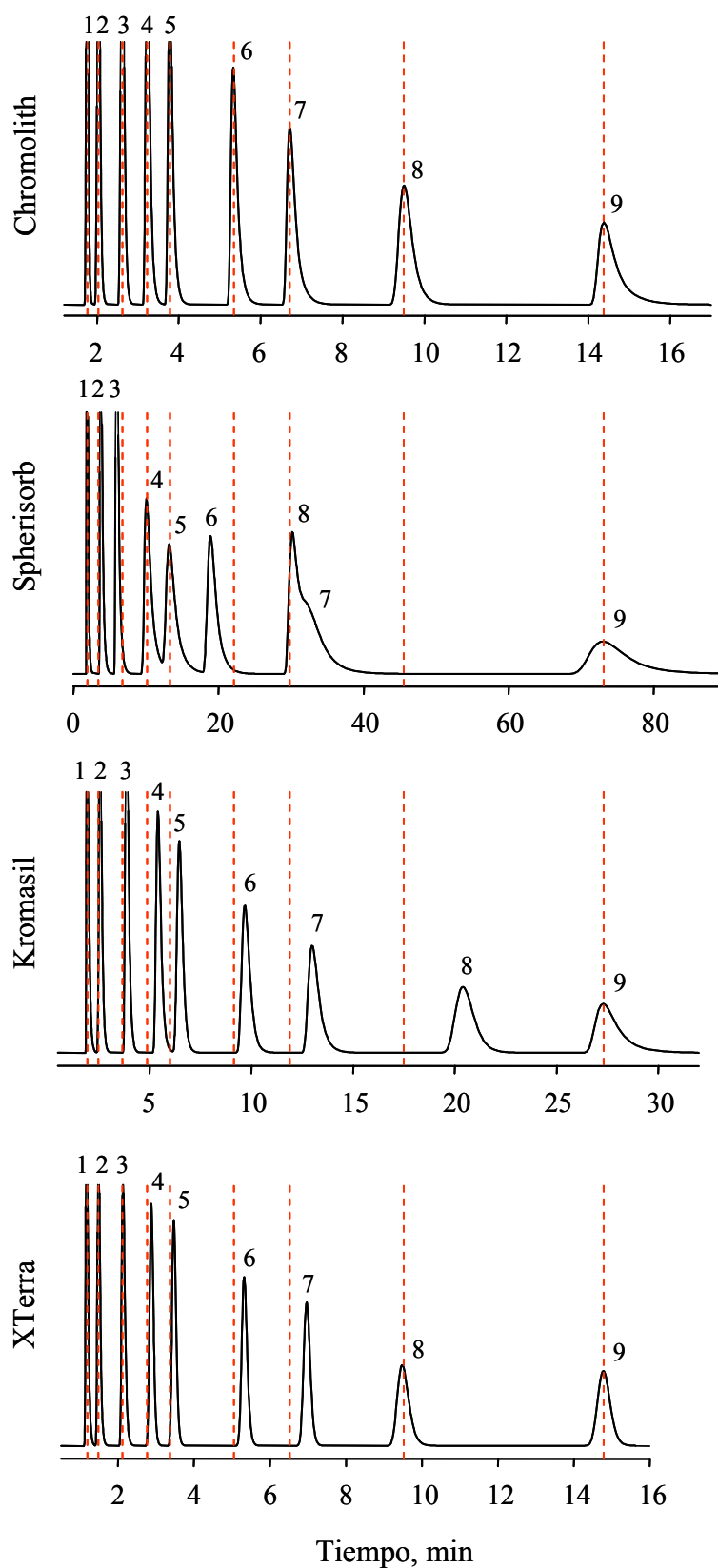
Las Figuras 8.3–8.5 muestran los cromatogramas obtenidos utilizando fases móviles con un contenido de acetonitrilo del 15, 20 y 25% (sólo 20 y 25% para la columna Spherisorb, que ofreció la menor fuerza eluyente) para una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes (se excluyó el timolol, que solapaba al menos parcialmente con acebutolol y metoprolol). La escala de tiempos de los cromatogramas se ajustó a un tamaño equivalente para facilitar la comparación. Nótese que con este propósito se hicieron coincidir los máximos de los primeros y últimos picos en todos los cromatogramas.



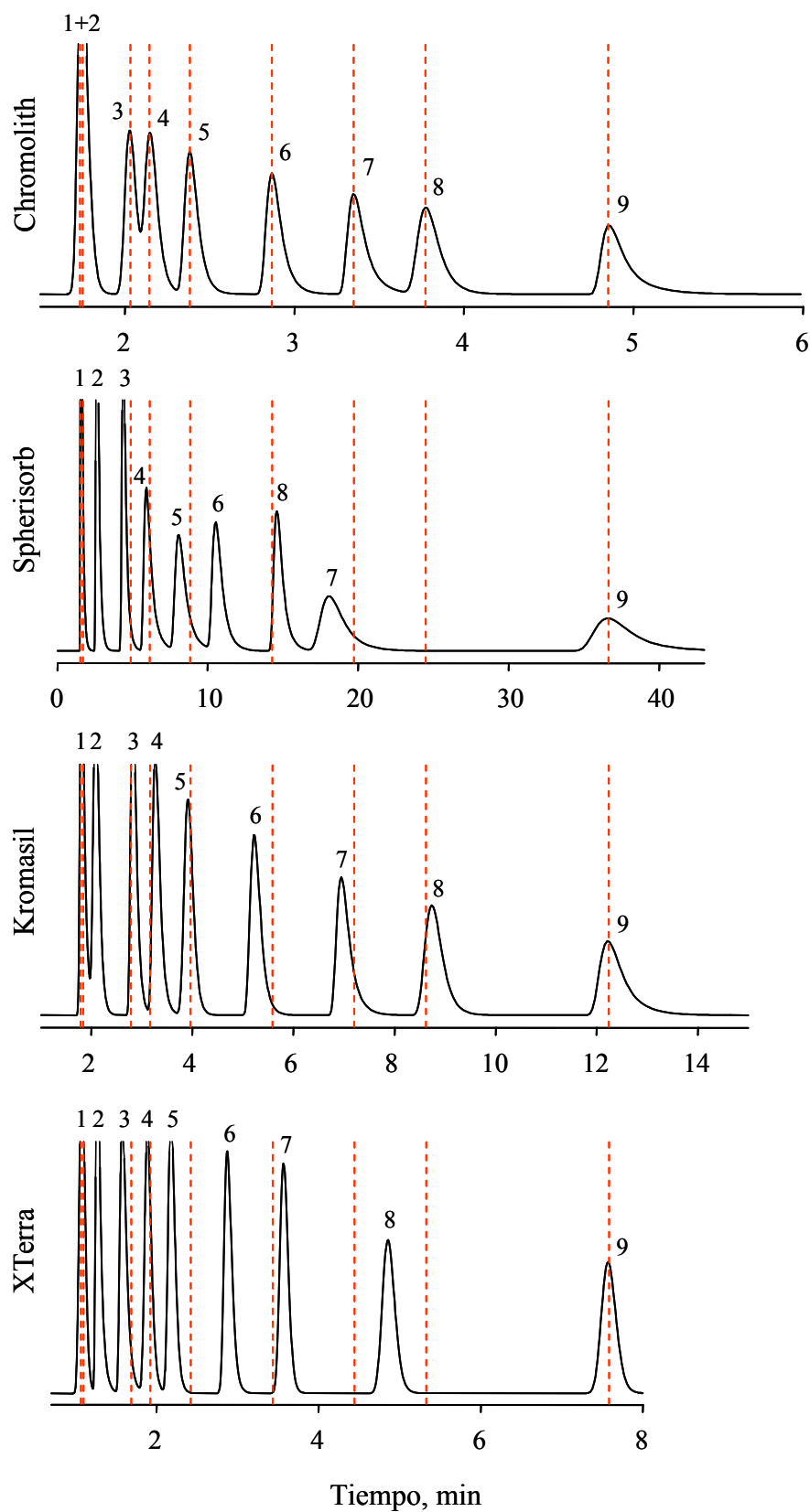
**Figura 8.2.** Exactitud en las predicciones de la retención utilizando la Ecuación (8.1) para los diez  $\beta$ -bloqueantes: (a) Chromolith, (b) Spherisorb, (c) Kromasil, y (d) XTerra.



**Figura 8.3.** Cromatogramas de una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes, eluidos con una fase móvil conteniendo 15% de acetonitrilo y utilizando diferentes columnas. Compuestos: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) pindolol, (4) acebutolol, (5) metoprolol, (6) esmolol, (7) oxprenolol, (8) labetalol, y (9) propranolol.



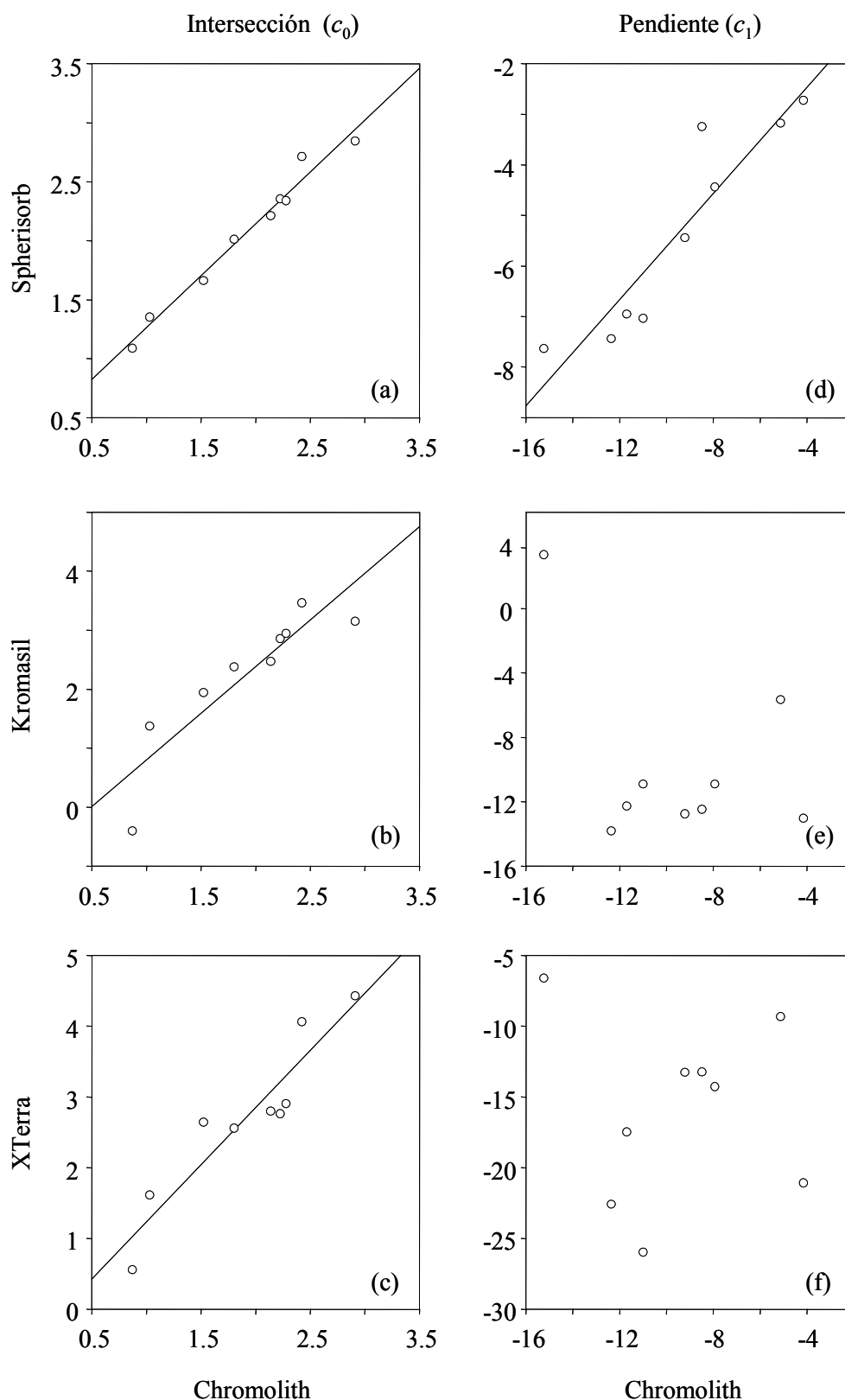
**Figura 8.4.** Cromatogramas de una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes, eluidos con una fase móvil conteniendo 20% de acetonitrilo y utilizando diferentes columnas. Véase la Figura 8.3 para identificar los picos.



**Figura 8.5.** Cromatogramas de una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes, eluidos con una fase móvil conteniendo 25% de acetonitrilo y utilizando diferentes columnas. Véase la Figura 8.3 para identificar los picos.

El orden de elución en los cromatogramas fue el mismo para las columnas Chromolith, Kromasil y XTerra, tal y como se ha comentado por otros autores para diferentes columnas y compuestos [5,32]. Sin embargo, el oxprenolol y el labetalol invirtieron su orden de elución con la columna Spherisorb. La máxima similitud se encontró entre los cromatogramas obtenidos con las columnas Chromolith y XTerra (ver Figuras 8.3 y 8.4), considerando la distribución de los picos (i.e. selectividad) y el tiempo de análisis. Sin embargo, para el máximo contenido de disolvente (25% de acetonitrilo, Figura 8.5), la distribución de los picos en estas columnas difiere (la selectividad cambia).

También se estudió la capacidad de retención de las diferentes columnas, en base a los modelos de retención. La Figura 8.6 compara los coeficientes  $c_0$  en la Ecuación (8.1) (que coinciden con el valor de  $\log k$  en agua pura), y  $c_1$  (a lo que se ha denominado “fuerza eluyente”) para el conjunto de  $\beta$ -bloqueantes separados con la columna Chromolith, frente a las columnas Spherisorb, Kromasil y XTerra. Sorprendentemente, las mejores correlaciones se obtuvieron para las columnas Chromolith y Spherisorb (aunque debe tenerse en cuenta el distinto orden de elución para el oxprenolol y el labetalol). Las correlaciones de  $c_0$  fueron algo deficientes para los pares Chromolith/Kromasil y Chromolith/XTerra. La correlación para los valores de  $c_{11}$  (no mostradas), que está asociada a la desviación de la relación lineal entre  $\log k$  y  $\phi$ , fue también satisfactoria para el par Chromolith/Spherisorb, y pobre para Chromolith/Kromasil y Chromolith/XTerra.



**Figura 8.6.** Correlaciones entre los coeficientes  $c_0$  y  $c_1$  en la Ecuación (8.1) para la Chromolith frente a las columnas: (a,d) Spherisorb, (b,e) Kromasil, y (c,f) XTerra.

#### **8.4.4. Transferencia entre columnas**

La transferencia de los análisis desde una columna C18 de micropartículas a las Chromoliths permite una ganancia en el tiempo de análisis. Para algunas columnas, esto es cierto incluso a los flujos bajos (del orden de  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ) generalmente empleados con las columnas de micropartículas (compárense los comportamientos de las columnas Chromolith y Spherisorb en la Figura 8.1), pero el mayor beneficio con las Chromoliths se alcanza al tener la posibilidad de incrementar el flujo a valores elevados. El interés por investigar si las separaciones llevadas a cabo en columnas C18 convencionales pueden transferirse a las Chromoliths no es, por lo tanto, sorprendente [18,20,28–31]. Sin embargo, incluso diversas columnas de micropartículas originan fuerzas eluyentes y selectividades diferentes. Por lo tanto, la transferencia de las separaciones desde una columna a otra no siempre tiene éxito. En un interesante estudio [29], se transfirieron seis métodos desarrollados en columnas convencionales de micropartículas C8 y C18 para el análisis de una mezcla de alquilbencenos, una mezcla de fármacos e impurezas, y un extracto de té verde, a las columnas Chromolith Performance y Chromolith SpeedROD. La transferencia de los métodos se realizó con éxito sólo para tres de los seis métodos.

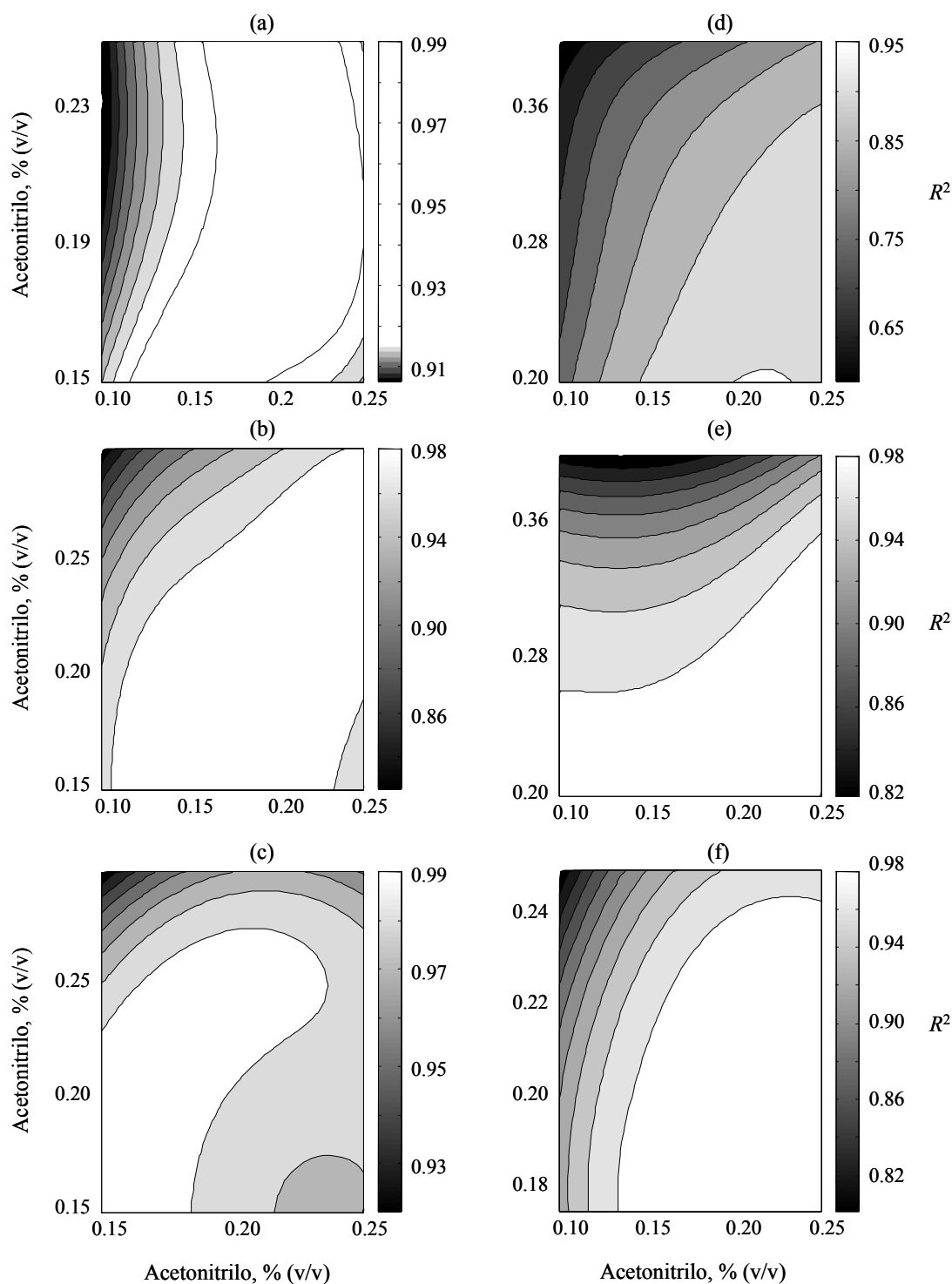
Tal y como se ha comentado, en la bibliografía, la comparación entre columnas en términos de selectividad se realiza generalmente a composiciones de fase móvil específicas. Nuestro propósito fue extender estos estudios a un intervalo amplio de composiciones. Según se ha comentado, los tiempos de análisis para la mezcla de  $\beta$ -bloqueantes, cromatografiada con las columnas Chromolith y XTerra, fueron similares en todo el dominio experimental (Figura 8.1, Sección 8.4.2). Esto facilitó la comparación directa de los cromatogramas, como se muestra en la Sección 8.4.3. En contraste, la columna Spherisorb proporcionó una retención mayor para los compuestos ensayados. Los tiempos de análisis para esta columna utilizando concentraciones de acetonitrilo del 25 y 30% fueron similares a los ofrecidos por la Chromolith Performance utilizando concentraciones del 15 y 20% (compárense los cromatogramas correspondientes en las Figuras 8.3 y 8.5). Sin embargo, incluso considerando la distinta fuerza eluyente, es evidente que las selectividades para las columnas Chromolith y Spherisorb difieren.



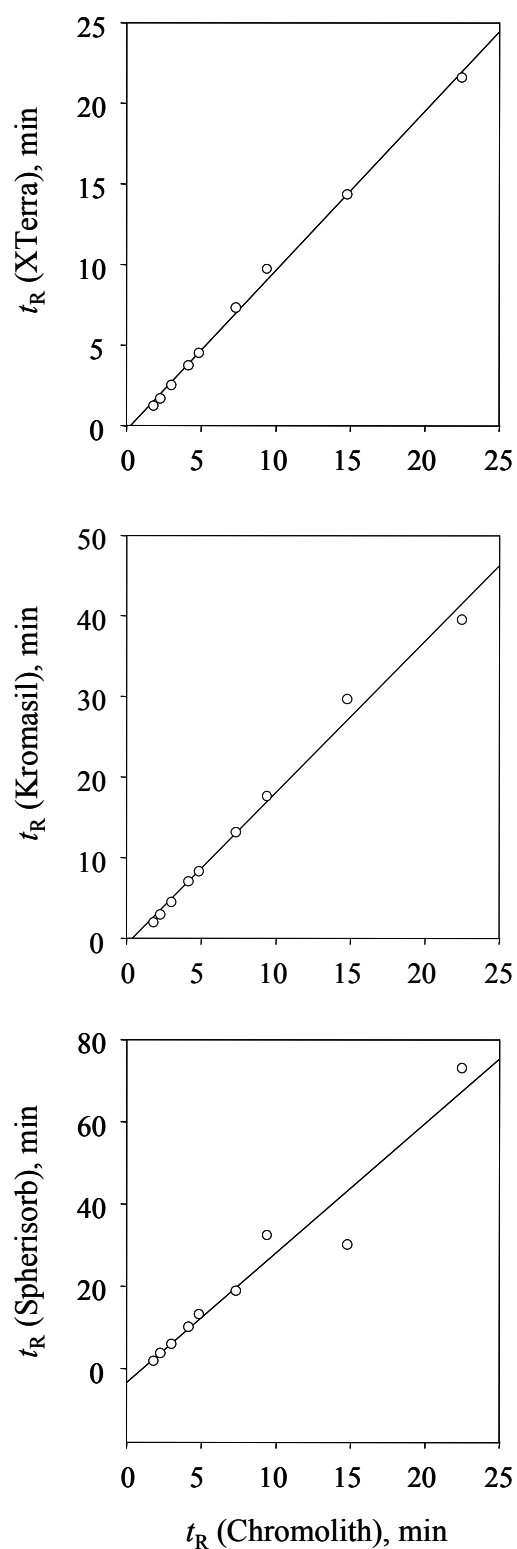
A la vista de estos resultados, decidimos explorar todo el dominio experimental con detalle para evaluar la similitud entre las columnas. Con este fin, se correlacionaron los tiempos de retención para el conjunto de  $\beta$ -bloqueantes separados con la columna Chromolith frente a los tiempos de retención para cada una de las tres columnas de micropartículas, a composición variable de la fase móvil. Los tiempos de retención para cada  $\beta$ -bloqueante se calcularon de acuerdo a la Ecuación (8.1) para 30–60 composiciones de fase móvil (dependiendo de la columna), distribuidas uniformemente en el intervalo considerado de contenido de acetonitrilo.

En la Figura 8.7 aparecen los mapas de contorno mostrando los valores de los coeficientes  $R^2$  para las correlaciones descritas, para composiciones de fase móvil variable. Se puede observar, tal como ya se ha comentado, que el par Chromolith/XTerra (Figura 8.7a) muestra la mayor similitud (con un valor máximo de  $R^2 = 0.99$ ) en un intervalo amplio de composiciones. La máxima similitud para el par Chromolith/Kromasil (Figura 8.7b) fue  $R^2 = 0.98$ , siendo ésta apreciablemente inferior para el par Chromolith/Spherisorb (Figura 8.7d), con  $R^2 = 0.95$  en tan sólo una región estrecha. El menor valor de  $R^2$  para la columna Spherisorb puede explicarse, al menos parcialmente, por el cambio en el orden de elución para el oxprenolol y el labetalol. Sin embargo, al eliminar el labetalol de la mezcla (Figura 8.7e), la similitud expresada como  $R^2$  se incrementó tan sólo a 0.98. Por otro lado, las Figuras 8.7b y c muestran que la columna Kromasil se asemeja más a la XTerra que a la Chromolith (con  $R^2 = 0.99$  frente 0.98).

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que es posible la transferencia de los análisis a la columna Chromolith Performance RP-18e a partir de las columnas XTerra y Kromasil (especialmente desde la XTerra), y que esto es cierto para un intervalo amplio de composiciones de fase móvil. Las Figuras 8.8a–c muestran las correlaciones entre los tiempos de retención de los  $\beta$ -bloqueantes, para diferentes pares de columnas cuando se eluyen con una fase móvil perteneciente a la región de similitud máxima para cada par.



**Figura 8.7.** Similitud en la selectividad, expresada como  $R^2$  para las correlaciones de los tiempos de retención de los nueve  $\beta$ -bloqueantes (los mismos de la Figura 8.3), separados en un par de columnas, en el dominio completo de composiciones de fase móvil. Columnas: (a) Chromolith/XTerra, (b) Chromolith/Kromasil, (c) Kromasil/XTerra, (d) Chromolith/Spherisorb, (e) Chromolith/Spherisorb (sin labetalol), (f) Chromolith/Spherisorb (ambas en presencia de 0.1% de TEA).



**Figura 8.8.** Correlación de los tiempos de retención para los nueve  $\beta$ -bloqueantes (los mismos de la Figura 8.3) eluidos con un par de columnas, utilizando una fase móvil perteneciente a la región que muestra una similitud máxima entre las dos columnas (véase Figura 8.7). La fase móvil contenía 18% de acetonitrilo para las columnas Chromolith, Kromasil y XTerra, y 20% para la Spherisorb.

#### **8.4.5. Perfil de pico**

Muchos fármacos y compuestos de importancia biomédica son bases, y por lo general, su análisis cromatográfico es problemático, debido a las interacciones de intercambio iónico que tienen lugar entre las especies protonadas con carga positiva y los grupos silanoles residuales ionizados sobre la superficie de las fases convencionales de base sílice. Esto da lugar a picos asimétricos y bajas eficacias. Los silanoles residuales son la consecuencia de un recubrimiento incompleto del material empacado. Además, las impurezas metálicas en la sílice pueden aumentar notablemente la acidez de los silanoles, y por lo tanto, incrementar las interacciones indeseadas con los analitos básicos. Otro factor importante para que tengan lugar dichas interacciones es la accesibilidad de los solutos a los grupos silanol. Este tópico, junto con los métodos propuestos para mejorar el comportamiento cromatográfico de las bases, ha sido estudiado y revisado extensamente [42–51].

Se consiguió una mejora considerable en el análisis de los compuestos básicos mediante RPLC con el desarrollo de sustratos de sílice de alta pureza (sílice de tipo B con un contenido bajo de metales). También se han desarrollado varias estrategias para disminuir el número de silanoles residuales en la superficie de la sílice. El proceso más común es la protección de la columna, que no elimina completamente los silanoles. La carga negativa (i.e. que denota un aumento de la ionización de los silanoles) es mayor en las columnas de tipo A que en las de tipo B, al menos por debajo de  $\text{pH} = 7$ . Sin embargo, los comportamientos varían dentro de límites amplios [50]. Con el fin de reducir la accesibilidad a los silanoles libres, se han desarrollado nuevos empaquetamientos con grupos diseñados especialmente para este fin (e.g. grupos voluminosos, bidentados, recubrimiento polimérico). Un ejemplo es la columna XTerra MS C18.

El tamaño relativamente grande de los macroporos en las Chromoliths, en comparación con el tamaño de los mesoporos, da lugar a eficacias de pico comparables a las obtenidas con columnas de micropartículas de tipo B de 3–5  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, se ha encontrado que los compuestos que presentan cola en las columnas de tipo B, también poseen cola en las Chromoliths [30,52]. Sin embargo, se ha publicado que los factores de asimetría para las columnas Chromolith son mayores respecto a los de las columnas empacadas para compuestos ácidos, básicos, e incluso neutros [2,48], lo que se ha explicado como debido a la heterogeneidad radial de la columna y/o la cinética lenta de

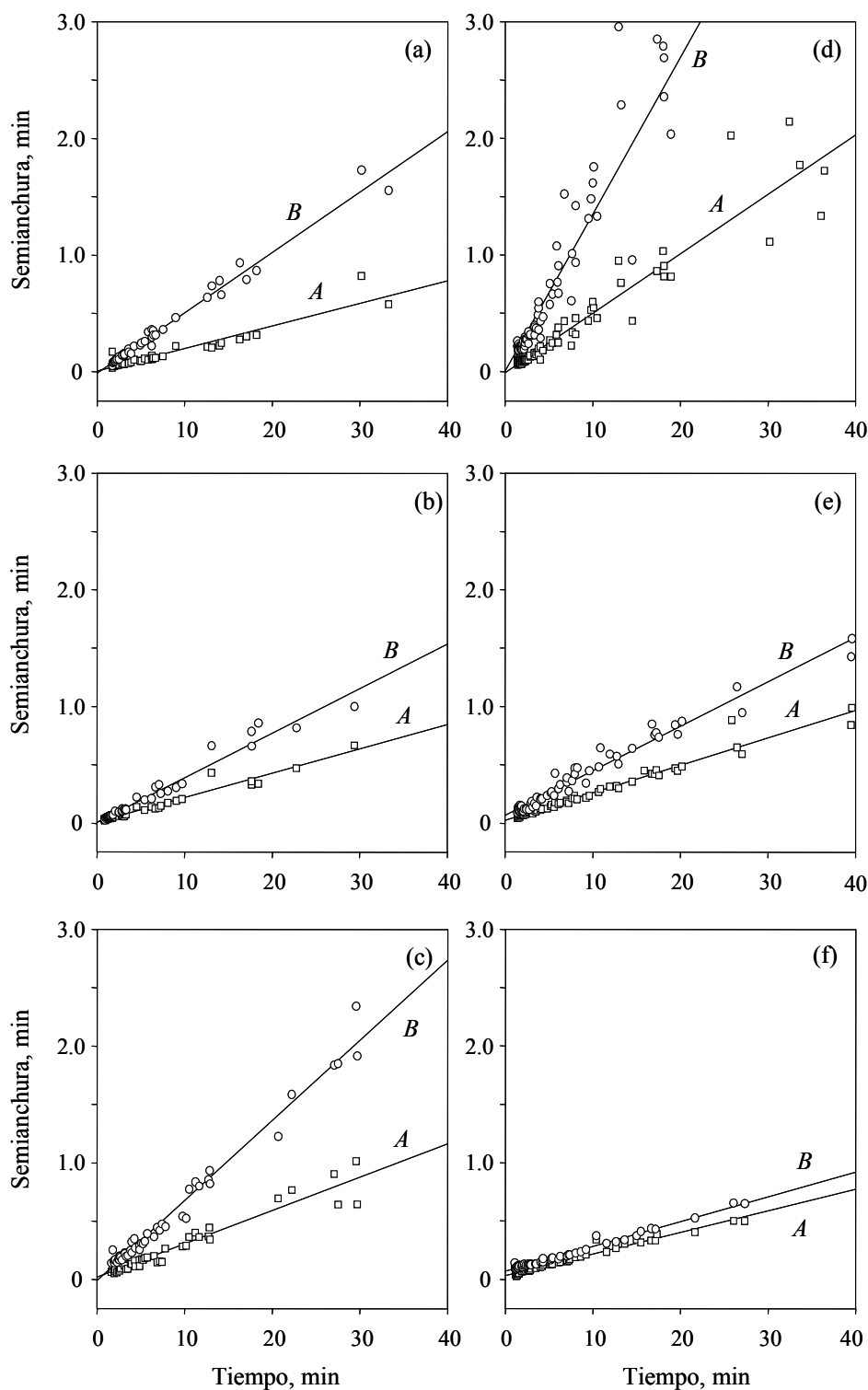
transferencia de masa [21]. Se ha sugerido que la ventaja de las Chromoliths es un tanto menor para los compuestos básicos, basándose en los perfiles de pico obtenidos para un número reducido de bases (piridina, 4-etilanilina, anilina, quinina y nortriptilina), separadas en diferentes columnas RP-18e: Chromolith, Inertsil ODS-3, SymmetryShield, y Purospher Star, todas ellas con unas dimensiones de 100×4.6 mm [52].

Para evaluar el comportamiento de las columnas cromatográficas, se examinan a menudo las eficacias y las asimetrías de compuestos particulares. En uno de tantos artículos, se compararon las características del perfil de pico de dos antibióticos (ciprofloxacina y vancomicina), cromatografiados en varias columnas, incluyendo la Chromolith SpeedROD RP-18e, para un amplio intervalo de composiciones de fase móvil [53]. Nosotros seguimos otro procedimiento. Medimos las semianchuras frontal ( $A$ ) y de cola ( $B$ ) al 10% de la altura de los picos cromatográficos de los diez  $\beta$ -bloqueantes eluidos a distintas composiciones de fase móvil, que representamos frente al tiempo de retención. Las Figuras 8.9a,c,d,f representan los valores de  $A$  y  $B$  para las cuatro columnas. Como se observa, existe una dependencia aproximadamente lineal entre las semianchuras de los picos y el tiempo de retención:

$$A = c_{0,A} + c_{1,A} t_R \quad (8.3)$$

$$B = c_{0,B} + c_{1,B} t_R \quad (8.4)$$

Los coeficientes de las Ecuaciones (8.3) y (8.4) para las cuatro columnas se recogen en la Tabla 8.3. Debe tenerse en cuenta que la medida de las semianchuras posee un cierto nivel de incertidumbre, especialmente para los compuestos más apolares (e.g. labetalol y propranolol en el conjunto de  $\beta$ -bloqueantes), que muestran picos fuertemente distorsionados en algunas condiciones. Para estos picos, no es fácil delimitar el dominio de tiempo del pico con el fin de medir su anchura. Esto puede explicar, al menos parcialmente, la dispersión en los gráficos de la Figura 8.9 (véanse también los coeficientes de regresión,  $R$ , en la Tabla 8.3). La medida de las semianchuras de los picos fue especialmente problemática para la columna Spherisorb. Por esta razón, los datos obtenidos con esta columna no se consideraron en la discusión de los resultados.



**Figura 8.9.** Correlación entre las semianchuras frontal (*A*) y de cola (*B*) de los picos cromatográficos con el tiempo de retención para los  $\beta$ -bloqueantes, separados en las siguientes columnas: (a) Chromolith sin TEA, (b) Chromolith con TEA, (c) Kromasil, (d) Spherisorb sin TEA, (e) Spherisorb con TEA, (f) XTerra. Se consideraron para cada columna todos los picos obtenidos en el dominio experimental completo.

**Tabla 8.3.** Parámetros de correlación de la semianchura frontal ( $A$ ) y de cola ( $B$ ) de los picos cromatográficos con el tiempo de retención para los diez  $\beta$ -bloqueantes.<sup>a</sup>

Columna	$c_{0,A}$	$c_{1,A}$	$R_A$	$c_{0,B}$	$c_{1,B}$	$R_B$
Chromolith RP-18e	-0.004	0.020	0.982	-0.027	0.053	0.997
Chromolith RP-18e con TEA	0.004	0.022	0.983	-0.009	0.041	0.993
Spherisorb ODS-2	-0.057	0.059	0.975	0.237	0.097	0.889
Spherisorb ODS-2 con TEA	0.023	0.023	0.983	0.056	0.042	0.944
Kromasil C18	-0.052	0.039	0.957	-0.070	0.077	0.990
XTerra MS C18	0.024	0.021	0.954	0.052	0.026	0.952

<sup>a</sup>  $c_{0,A}$ ,  $c_{1,A}$ ,  $c_{0,B}$ , y  $c_{1,B}$  son los coeficientes de regresión en las Ecuaciones (5.3) y (5.4), y  $R_A$  y  $R_B$  son los coeficientes de correlación correspondientes.

Tal y como expresan las Ecuaciones (8.3) y (8.4), las semianchuras  $A$  y  $B$  presentan una dependencia casi lineal con el tiempo de retención de los solutos, el que a su vez se halla correlacionado con la composición de la fase móvil mediante la Ecuación (8.1) (con coeficientes particulares para cada soluto). La correlación entre las semianchuras y los tiempos de retención es útil para predecir (al menos aproximadamente) el perfil de pico (asimetría,  $B/A$ , y eficacia,  $N$  [54]):

$$N = \frac{41.7 \left( \frac{t_R}{A+B} \right)^2}{1.25 + \frac{B}{A}} \quad (8.5)$$

para compuestos individuales eluidos a una determinada composición de fase móvil, y se ha aplicado con éxito con propósitos de optimización en columnas de micropartículas [55]. En cualquier caso, dicha correlación facilita la comparación de eficacias entre columnas.

Las pendientes  $c_{1,A}$  y  $c_{1,B}$  de las Ecuaciones (8.3) y (8.4) ofrecen información sobre el comportamiento general del perfil de los picos: la suma de las pendientes se relaciona con la eficacia de la columna, mientras que su cociente ( $c_{1,B}/c_{1,A}$ ) es una medida global asociada a la asimetría de los picos (2.65 para la Chromolith, 1.97 para la Kromasil, 1.64 para la Spherisorb y 1.24 para la XTerra). Dejando de lado la columna Spherisorb, la columna Kromasil mostró las peores eficacias seguida de la Chromolith y la XTerra. Por otro lado, la mayor pendiente para la semianchura  $B$  indica que los picos tienen tendencia a eluir con cola en todas las columnas.

Como se ha comentado, la razón de la producción de colas en los picos cromatográficos con las columnas de base sílice es la interacción de los analitos básicos con los silanoles ionizados, [37,38,50]. Con el fin de evitar este efecto, es usual trabajar a pH bajo (en este trabajo, la fase móvil se tamponó a pH 3.0). Como esto no es suficientemente efectivo en muchos casos, otro método comúnmente utilizado consiste en añadir un contraión amínico al eluyente como agente bloqueante de los silanoles, siendo la trietilamina (TEA) uno de los compuestos más frecuentes [47,56]. Así, se ha comentado también una ligera mejora en la simetría de los picos para un compuesto básico, la vancomicina, utilizando una columna Chromolith SpeedROD RP-18e mediante la adición de TEA [56].

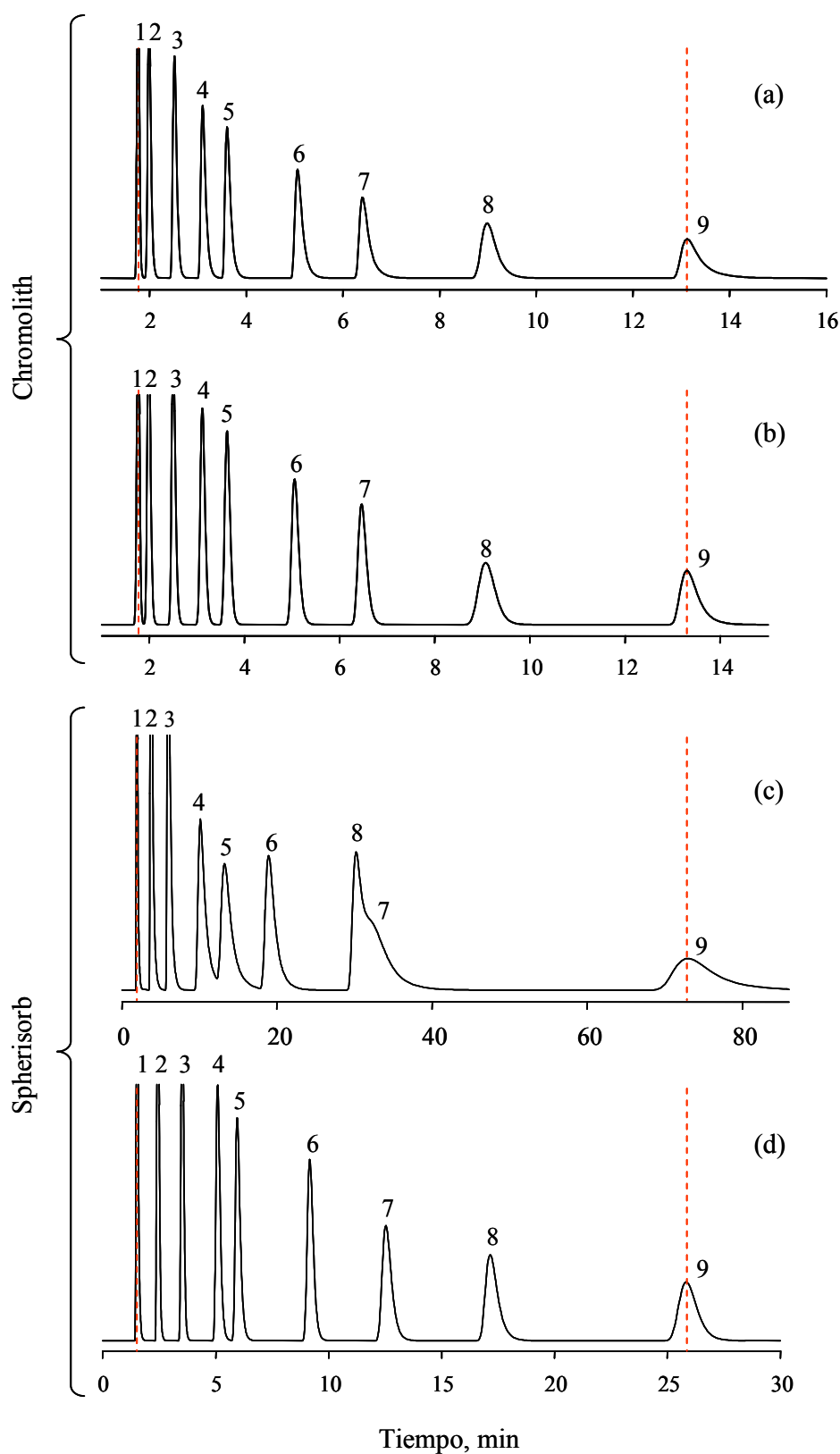


Desarrollamos de nuevo los diseños experimentales para las columnas Chromolith y Spherisorb, en los intervalos 10–25% y 15–25% de acetonitrilo, respectivamente, en presencia de 0.1% de TEA. La Figura 8.10 muestra los cromatogramas obtenidos con una fase móvil que contenía un 20% de acetonitrilo y 0.1% de TEA, para las dos columnas. Como se observa, la adición de TEA dio lugar a una reducción importante de los tiempos de retención con la columna Spherisorb (Figura 8.10c,d, compárese también con la Figura 8.1), mientras que el cambio en la retención fue mínimo para la columna Chromolith. Esto concuerda con una observación previa indicando que en contraste con lo que ocurre con las fases de base sílice de tipo A, el bloqueante amínico no muestra un efecto apreciable sobre la retención de los compuestos básicos con los materiales de base sílice de tipo B [47].

En contraste, la adición de TEA produjo beneficios en relación a la mejora del perfil de pico para ambas columnas (Chromolith y Spherisorb), pero el resultado más significativo es que las eficacias, caracterizadas por la suma de  $c_{1,A}$  y  $c_{1,B}$ , y el grado de asimetría ( $c_{1,B}/c_{1,A}$ ) se hicieron similares al adicionar TEA (0.063 frente 0.065, y 1.86 frente 1.83, respectivamente, véase también las Figuras 8.9b,e). Esto significa que la actividad de los silanoles en ambas columnas se asemeja en presencia de TEA. Existe otro resultado interesante en relación a ambas columnas (Chromolith y Spherisorb): la similitud en las selectividades a lo largo de todo el dominio experimental aumentó significativamente al añadir TEA (compárense las Figuras 8.7d y f).

#### **8.4.6. Resolución**

El interés del cromatografista está centrado en obtener una buena resolución (en tiempos de análisis suficientemente cortos), lo que depende de la selectividad y el perfil de pico. Con el fin de medir (y optimizar) la resolución, utilizamos de nuevo el concepto de pureza de pico, que cuantifica el porcentaje del área del pico que está libre de interferencias [57]. La pureza de pico es una función objetivo que tiene en cuenta la selectividad (i.e. distribución de los picos), el perfil de los picos (eficacias y asimetrías), y su tamaño (relacionado con la concentración de los solutos y la respuesta del instrumento). El valor de pureza de pico oscila entre  $p_i = 0$  cuando el solapamiento del pico de interés es completo, hasta  $p_i = 1$  cuando el pico se halla totalmente resuelto. La



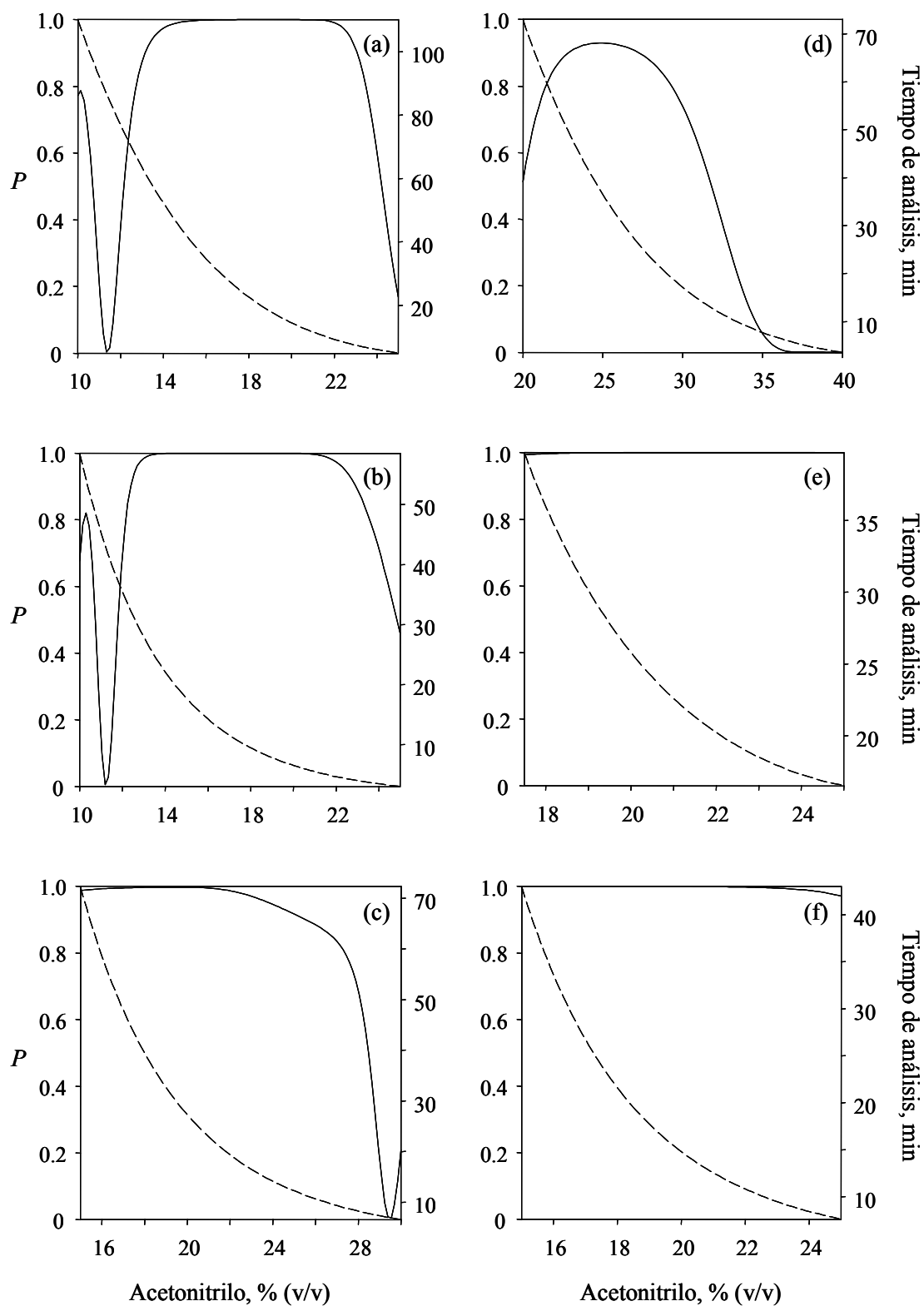
**Figura 8.10.** Cromatogramas de una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes obtenido con: (a,b) Chromolith, y (c,d) Spherisorb, utilizando una fase móvil conteniendo un 20% de acetonitrilo sin TEA (a,c), y en presencia de 0.1% de TEA (b,d). Véase la Figura 8.3 para identificar los picos.

separación global en los cromatogramas se evaluó mediante el producto de las purezas de pico elementales [58].

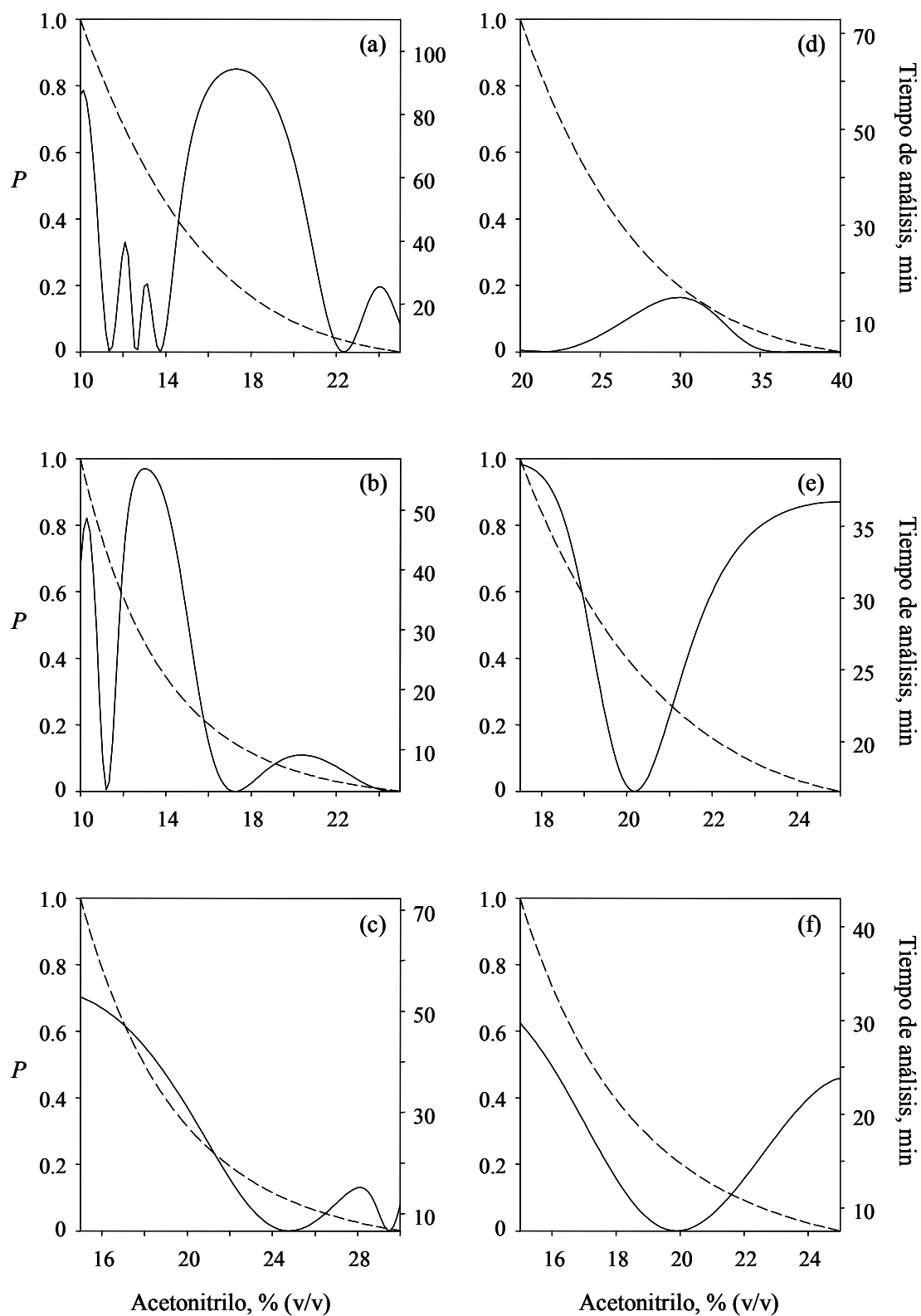
En la Figura 8.11 aparecen los diagramas de resolución (líneas continuas) para la separación de los nueve  $\beta$ -bloqueantes cromatografiados con las cuatro columnas, considerando el dominio experimental completo. Se han superpuesto los tiempos de análisis (líneas discontinuas). Como ya se observó en las Figuras 8.3–8.5, se consiguió una buena resolución en un intervalo amplio de composiciones, correspondiendo la situación más crítica a la columna Spherisorb en ausencia de TEA, seguida de la columna Kromasil. En contraste, la resolución fue completa ( $P = 1$ ) en todo el intervalo de condiciones de trabajo para la columna Spherisorb en presencia de TEA (Figura 8.11e), y casi completa para la columna XTerra (Figura 8.11f).

La Figura 8.12 muestra los diagramas de resolución para una mezcla más compleja que incluye timolol, que como se comentó, solapa críticamente con acebutolol y metoprolol. Sin TEA, sólo la columna Chromolith fue capaz de resolver (y tan sólo parcialmente) los picos críticos, siendo la resolución máxima extremadamente pobre para las otras columnas. Mientras tanto, en presencia de TEA, ambas Chromolith y Spherisorb resolvieron con éxito los pares críticos a contenidos bajos de acetonitrilo, siendo el tiempo de análisis de la mezcla de los diez  $\beta$ -bloqueantes algo más bajo para la primera columna (por debajo de los 30 min).

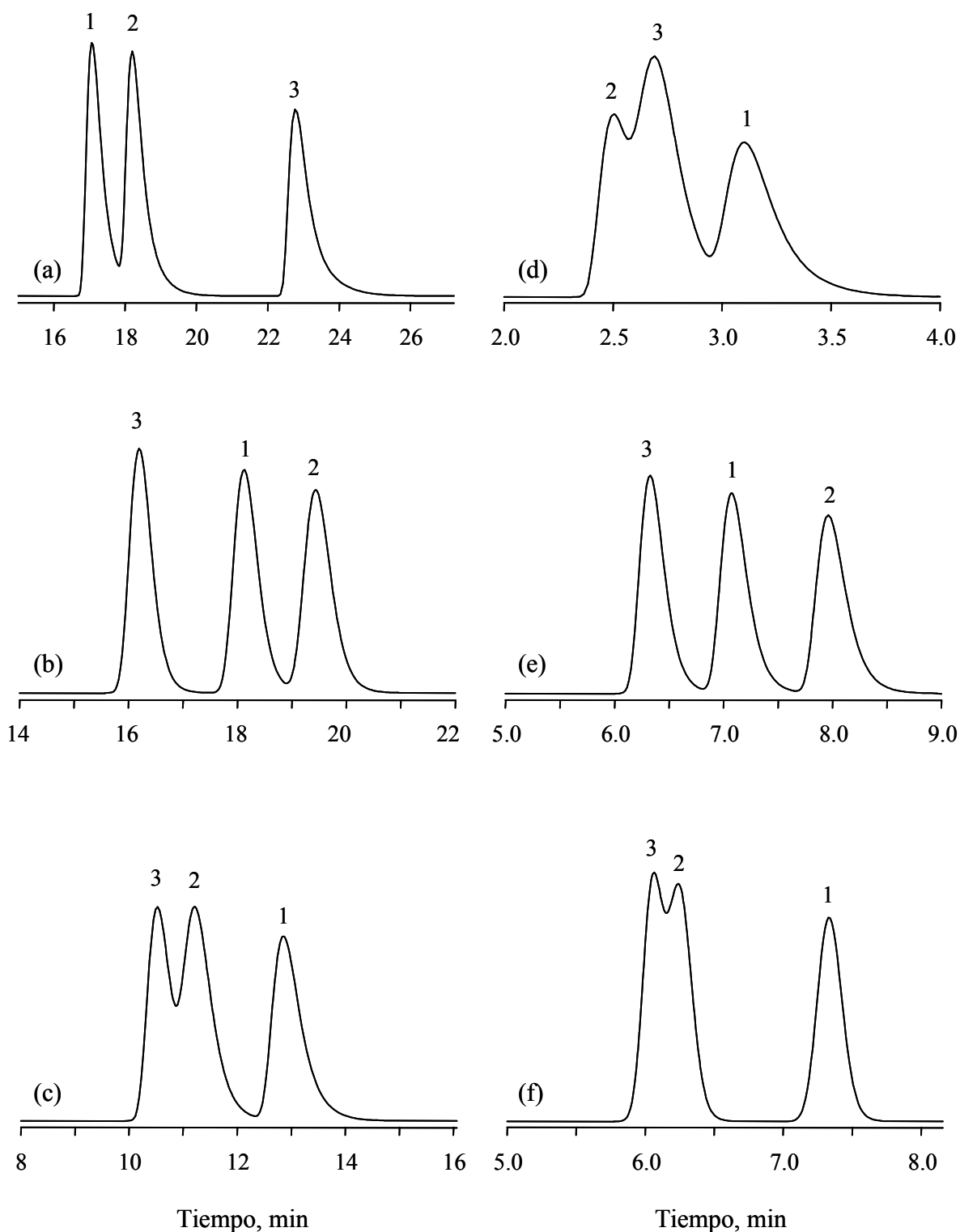
La Figura 8.13 ilustra la sección de los cromatogramas donde eluyen los tres picos críticos para las composiciones de fase móvil óptimas. Sin TEA, las columnas ofrecieron distinto orden de elución (sólo fue el mismo para las columnas Kromasil y XTerra). Sin embargo, cuando se añadió TEA, el orden de elución para las columnas Chromolith y Spherisorb fue el mismo, y diferente del que se encontró para estas columnas en ausencia de TEA (i.e. las selectividades para los picos críticos fue de nuevo similar).



**Figura 8.11.** Diagramas de resolución (líneas continuas) y tiempos de análisis (líneas discontinuas) para una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes (los mismos de la Figura 8.3). Columnas: (a) Chromolith sin TEA, (b) Chromolith con TEA, (c) Kromasil, (d) Spherisorb sin TEA, (e) Spherisorb con TEA, y (f) XTerra.



**Figura 8.12.** Diagramas de resolución (líneas continuas) y tiempos de análisis (líneas discontinuas) para una mezcla de los diez  $\beta$ -bloqueantes (incluyendo el timolol). Columnas: (a) Chromolith sin TEA, (b) Chromolith con TEA, (c) Kromasil, (d) Spherisorb sin TEA, (e) Spherisorb con TEA, y (f) XTerra.



**Figura 8.13.** Cromatogramas óptimos para una mezcla de: (1) metoprolol, (2) acebutolol, y (3) timolol, obtenidos con: (a) Chromolith y 10% de acetonitrilo ( $P = 0.895$ ), (b) Chromolith y 10% de acetonitrilo/0.1% de TEA ( $P = 0.981$ ), (c) Kromasil y 15% de acetonitrilo ( $P = 0.703$ ), (d) Spherisorb y 35.8% de acetonitrilo ( $P = 0.392$ ), (e) Spherisorb y 17.5% de acetonitrilo/0.1% de TEA ( $P = 0.983$ ), y (f) XTerra y 15% de acetonitrilo ( $P = 0.626$ ).

## 8.5. Conclusiones

Se han publicado numerosos artículos, en los que se compara el comportamiento de las columnas Chromolith con una o más columnas de micropartículas del mismo tipo, pero producidas por distinto fabricante. Estas comparaciones se realizan por lo general a sólo una o a unas pocas composiciones de fase móvil. En algunos casos, se ha observado alguna similitud entre las columnas, respecto a la selectividad. En otros casos, las columnas parecen poseer comportamientos distintos. Sin embargo, las similitudes pueden depender de la composición de la fase móvil. Por esta razón, en este trabajo, las comparaciones entre columnas se extendieron a un intervalo de composiciones. El modelo cuadrático de  $\log k$  frente a  $\phi$ , que proporciona predicciones de gran exactitud en un intervalo amplio de composiciones, facilitó el estudio. El ajuste de este modelo puede realizarse con los datos de retención asociados a tan sólo 3–4 composiciones de la fase móvil.

Existe una amplia variedad de columnas empacadas de base sílice, disponibles en el mercado. Como se ha comentado, dejando de lado la posibilidad de trabajar a flujos elevados, los datos de la bibliografía indican que las columnas Chromolith no presentan diferencias en su comportamiento de retención respecto a las columnas empacadas, más allá de las que podría haber entre dos columnas empacadas de distinto fabricante. No dejando de lado esta idea, en este trabajo se comparó la columna Chromolith con tres columnas de micropartículas fabricadas con diferentes tipos de sílice: Spherisorb (sílice de tipo A), Kromasil (tipo B) y XTerra (tipo B combinada con metilsilano).

Nos interesaba examinar el comportamiento de la columna Chromolith para un grupo específico de compuestos (varios  $\beta$ -bloqueantes), y con este fin se realizó una comparación exhaustiva, incluyendo todas las características cromatográficas relevantes: tiempo de análisis, selectividad, perfil de pico (eficacia y asimetría) y resolución. El estudio mostró que la columna Chromolith posee características favorables respecto a otras columnas en el análisis de  $\beta$ -bloqueantes, que son fármacos básicos típicos. Esta conclusión contrasta con comentarios previos sobre la ineficacia de las Chromoliths para el análisis de compuestos básicos [52].

Observamos que la columna Chromolith se comporta de manera similar a la columna XTerra en términos de tiempo de análisis y selectividad, en un amplio intervalo de composiciones de fase móvil, aunque el perfil de pico es mejor para la columna XTerra (al menos a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ). Aunque en menor medida, las selectividades para las columnas Chromolith y Kromasil también son similares, pero con tiempos de análisis más elevados para la última. Al añadir 0.1% de TEA a las columnas Chromolith y Spherisorb, los perfiles de pico y las selectividades, que diferían significativamente en ausencia de TEA, se hicieron muy similares. Esto puede indicar que se alcanza el mismo grado de bloqueo de los grupos silanol para ambas columnas en presencia de TEA.

La gran ventaja de las columnas Chromolith de permitir flujos elevados con una sobrepresión baja no debería pasarse por alto. Sin embargo, para fomentar el uso de este tipo de columnas sería conveniente la comercialización de columnas de diferentes marcas, como es el caso de los centenares de columnas de micropartículas que existen en el mercado.

## 8.6. Referencias

1. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J. High Resol. Chromatogr. 23 (2000) 93.
2. N. Wu, J. Dempsey, P.M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvratt, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 149.
3. A. Detroyer, Y. Vander-Heyden, K. Reynaert, D.L. Massart, Anal. Chem. 76 (2004) 1903.
4. C. Legido-Quigley, N.W. Smith, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 61.
5. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, J. Chromatogr. A 1036 (2004) 127.
6. D.B. Gomis, N.S. Núñez, M.D. Gutiérrez Álvarez, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 29 (2006) 931.
7. T. Yoshida R.E. Majors, J. Separ. Sc. 29 (2006) 2421.
8. D. Guillarme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (2008) 430.
9. H.A. Naeem, H.D. Sapirstein, J. Cereal Sc. 46 (2007) 157.



10. X. Yang, L. Ma, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 213.
11. N. Wu, A.M. Clausen, *J. Separ. Sc.* 30 (2007) 1167.
12. F. Svec, C.G. Huber, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2100.
13. B.A. Olsen, B.C. Castle, D.P. Myers, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 796.
14. N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 35.
15. A.M. Siouffi, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 86.
16. K. Mistry, N. Grinberg, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 28 (2005) 1055.
17. K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 163.
18. D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, C. Shaefer, D. Cunningham, *LC-GC* 19 (2001) 1186.
19. H. Tanaka, N. Ishizuka, K. Hosoya, K. Kimata, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, *Kuromatogurafi* 14 (1993) 50.
20. K. Cabrera, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 843.
21. K. Miyabe, G. Guiochon, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 853.
22. B. Bidlingmaier, K.K. Unger, N. von Doehren, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 11.
23. P. Zöllner, A. Leitner, D. Lubda, K. Cabrera, W. Lindner, *Chromatographia* 52 (2000) 818.
24. G. Dear, R. Plumb, D. Mallett, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 152.
25. L. Spoof, J. Meriluoto, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 237.
26. F. Gritti, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5726.
27. F.C. Leinweber, U. Tallarek, *J. Chromatogr. A* 1006 (2003) 207.
28. J.H. Smith, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Sci.* 41 (2003) 209.
29. A.M. van Nederkassel, A. Aerts, A. Dierick, D.L. Massart, Y. Vander-Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 233.
30. Y. Chu, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 113.
31. L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 191.
32. M. Cledera Castro, A. Santos Montes, R. Izquierdo Hornillos, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 57.
33. L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, I. Svobodová, P. Solich, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 11.

34. F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 53.
35. The United States Pharmacopoeia, Rockville, MD, EE.UU.
36. J. Köhler, J.J. Kirkland, *J. Chromatogr.* 385 (1987) 125.
37. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J Chromatogr A* 1000 (2003) 757.
38. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, P.W. Carr, L.R. Snyder, *J Chromatogr A* 1026 (2004) 77.
39. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>a</sup> ed., Wiley/Interscience, Nueva York, 1997, pp. 178–182.
40. J.M. Cruikshank, *β-Blockers in Clinical Practice*, Churchill-Livingstone, Nueva York, 1994.
41. A. Detroyer, Y. Vander-Heyden, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 211.
42. M.A. Stadalius, J.S. Berus, L.R. Snyder, *LC-GC* 6 (1988) 494.
43. M. Reta, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 121.
44. D.V. McCalley, *LC-GC* 17 (1999) 440.
45. S.D. Rogers, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 57.
46. M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. Sc.* 41 (2003) 350.
47. X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3153.
48. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 17.
49. J.J. Kirkland, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 9.
50. J.M. Herrero Martínez, A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 135.
51. M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202.
52. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 51.
53. P. Forlay-Frick, Z.B. Nagy, H. Fekete, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 25 (2002) 1431.
54. J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 57 (1983) 730.
55. J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
56. P. Forlay-Frick, J. Fekete, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 27 (2004) 123.
57. S.J. López Grío, G. Vivó Truyols, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 187.
58. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 61.

## Capítulo 9

### Estimación de $\log P_{o/w}$ mediante un nuevo método cromatográfico

#### 9.1. Resumen

Se propone un nuevo método cromatográfico para la estimación del logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log P_{o/w}$ ), basado en un modelo publicado previamente (Bosch *et al.*, Anal. Chim. Acta 299 (1994) 219), que relaciona el logaritmo del factor de retención en cromatografía líquida en fase inversa con parámetros de polaridad del soluto ( $p$ ), de la fase móvil ( $P_m^N$ ) y de la fase estacionaria ( $P_s^N$ ). Los descriptores  $p$  dependen también del sistema cromatográfico, pero es posible establecer correlaciones entre los valores correspondientes a cualquier sistema cromatográfico, lo que permite la transferencia entre sistemas. Por otro lado, en el marco de las relaciones cuantitativas estructura-propiedad se ha demostrado que el parámetro  $p$  depende principalmente de la hidrofobicidad del compuesto expresada como  $\log P_{o/w}$ , y de cuatro descriptores adicionales que pueden calcularse a partir de la estructura molecular del soluto mediante el programa CODESSA. En este capítulo, se muestra el cálculo de los descriptores  $p$  para un amplio conjunto de compuestos orgánicos de estructuras muy variadas en dos columnas (Luna C18 y Chromolith Performance RP-18) utilizando fases móviles de acetonitrilo-agua y metanol-agua, y su transferencia a un sistema de referencia (columna Spherisorb ODS-2 y fases móviles de acetonitrilo-agua). A continuación, los parámetros estructurales de los compuestos calculados con CODESSA y la relación establecida entre los valores de  $p$  de las columnas Luna C18/Chromolith y el sistema de referencia se utilizan para predecir los valores de  $\log P_{o/w}$ . El método proporcionó resultados satisfactorios para compuestos diversos en un amplio intervalo de valores de  $\log P_{o/w}$  (0–6.5).

## 9.2. Introducción

La gran mayoría de compuestos orgánicos presenta una limitada solubilidad en agua a temperatura y presión ordinarias. En general, los compuestos que contienen en su estructura únicamente carbono e hidrógeno son más solubles en disolventes de carácter apolar, como tetracloruro de carbono, benceno o hexano. Por su parte, el agua (disolvente polar por excelencia) es adecuada para los compuestos orgánicos que presentan grupos afines (e.g.  $R-OH$ ,  $R-COOH$ ,  $R-NH_2$ ). A partir de estas consideraciones, cabría pensar que el equilibrio de distribución de los compuestos orgánicos entre dos disolventes inmiscibles (como agua y *n*-octanol) debe permitir algún tipo de medida directa de la hidrofobicidad de los solutos, puesto que ésta se relaciona directamente con la magnitud del reparto. Un modo lógico de aprovechar este fenómeno para medir la hidrofobicidad es mediante el cociente de las concentraciones que el compuesto alcanza en la fase más apolar respecto de la concentración alcanzada en la fase más polar, una vez establecido el equilibrio. No obstante, debe hacerse notar que la distribución entre fases en algunos casos no depende exclusivamente de la afinidad del compuesto por cada disolvente, sino que puede verse alterada por otros procesos químicos (e.g. ionización, agregación, formación de pares iónicos, etc.). Además, es necesario conocer la concentración total de los solutos. Si la cantidad de soluto es demasiado elevada, pueden producirse interacciones soluto-soluto que afecten al proceso de distribución, que no deben ignorarse [1].

Uno de los primeros estudios realizados a principios del siglo XX demostró que la acción fisiológica de los narcóticos estaba relacionada con sus coeficientes de reparto agua-aceite (se utilizaba principalmente aceite de oliva). Fue a partir de 1950, especialmente con los trabajos de Fujita *et al.* [2], cuando se generalizó el uso del logaritmo del coeficiente de reparto *n*-octanol/agua para medir la lipofilia de un compuesto, y se empezó a relacionar con la interacción de los compuestos orgánicos con los organismos vivos o los procesos celulares.

El octanol, como la mayoría de disolventes orgánicos, es menos denso que el agua y aunque se les suele considerar inmiscibles, lo cierto es que existe una cierta solubilidad mutua debida a la presencia del grupo hidroxilo del octanol. Esta característica le confiere al octanol un carácter ligeramente distinto respecto a los hidrocarburos y otros disolventes apróticos. Debe indicarse que las correlaciones entre los coeficientes de

reparto y la actividad biológica son siempre mejores en el sistema octanol/agua que en pares hidrocarburo-agua. Cabe recordar que el octanol es anfifílico y puede formar enlaces de hidrógeno, al igual que los fosfolípidos y proteínas que se encuentran en las membranas celulares. Por ello, el logaritmo de reparto octanol/agua se ha utilizado frecuentemente en el estudio de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR, *quantitative structure-activity relationships*), desarrollados en los campos farmacéuticos, medioambientales, bioquímicos y toxicológicos.

### 9.2.1. El coeficiente de reparto octanol/agua: nomenclatura y aplicaciones

El coeficiente de reparto octanol/agua se define como la relación de concentraciones que el soluto alcanza al establecerse el equilibrio de distribución del mismo entre octanol saturado en agua, y agua saturada en octanol:

$$\text{Coef.de reparto} = \frac{[X]_{\text{octanol}}}{[X]_{\text{agua}}} \quad (9.1)$$

Por la considerable amplitud de la escala de los valores del coeficiente de reparto octanol/agua, en la bibliografía se ofrecen expresados como logaritmos decimales. Además, se encuentran diferentes expresiones para dicho coeficiente: *D* (*distribution*), *P* (*partition*), *V* (*verteilungskoeffizient*) y *K*. Para aludir al coeficiente de reparto verdadero (i.e. las mismas especies en ambos disolventes y disoluciones diluidas), se utiliza bien  $P_{o/w}$  (estudios de farmacia y medicina), o bien  $K_{o/w}$  (estudios medioambientales y toxicológicos, e.g. bioacumulación de contaminantes en pescado y otros organismos, o estudios sobre la distribución de estos compuestos en el sistema suelo-agua). Cuando el soluto participa en algún equilibrio químico secundario en una o en ambas fases, se utiliza  $D_{o/w}$  [3]. Puesto que este capítulo está enfocado hacia la vertiente farmacéutica, utilizaremos  $P_{o/w}$  y  $\log P_{o/w}$  para referirnos al coeficiente de reparto octanol/agua y a su logaritmo decimal, respectivamente.

### **9.2.2. Métodos para la estimación del coeficiente de reparto octanol/agua de compuestos orgánicos**

#### **a) Método del equilibrado de fases (*shake-flask method*)**

Es el procedimiento clásico para la medida de  $\log P_{o/w}$  y fue incluido como procedimiento estándar por la OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) en 1981. En este método, el soluto se disuelve en una de las fases y a continuación, mediante agitación, se permite que entre en contacto con la otra y se distribuya. Una vez alcanzado el equilibrio, se aíslan las fases, y se determina la concentración que se ha alcanzado en cada una de ellas. Los valores de  $\log P_{o/w}$  que pueden estimarse mediante este procedimiento quedan limitados al intervalo  $-2$  a  $+4$ , y de manera ocasional hasta  $+5$  [3,4]. En el caso de que el soluto que se estudie sea ionizable, la medida tendrá que realizarse a un valor de pH que garantice el predominio de la forma neutra, mediante la adición a la fase acuosa de un tampón adecuado.

El método del equilibrado de fases se basa en la ley de reparto de Nernst, que se establece para disoluciones diluidas a temperatura, presión y pH constantes. Esta ley es válida para un compuesto puro que se distribuye entre dos disolventes puros, con una concentración del soluto en cada fase inferior a 0.01 M. En caso de que existan otros solutos en una de las fases (o en ambas al mismo tiempo), los resultados pueden verse afectados, puesto que cualquier proceso de asociación o disociación de las moléculas disueltas afectaría a la distribución y daría lugar a desviaciones [4].

En principio, el método parece sencillo de aplicar, pero no lo es tanto en la práctica, especialmente si se desea un resultado de calidad en términos de precisión y exactitud. Para lograrlo:

- (i) tanto los disolventes como el soluto han de poseer una elevada pureza, con el fin de evitar alteraciones por la interacción con los compuestos acompañantes, que como se ha indicado, pueden afectar al reparto,
- (ii) el soluto debe alcanzar una concentración suficiente para su medida, ya sea en el agua o en el octanol, lo que no siempre se logra debido a su escasa solubilidad,
- (iii) los disolventes deben encontrarse saturados entre sí, lo que se consigue tras 24 horas de contacto mutuo [4],

- (iv) deben considerarse diversos factores experimentales: los tiempos de agitación y de reposo, la temperatura de operación, la fuerza iónica y el pH de la fase acuosa. La separación de las fases requiere una manipulación cuidadosa, con el fin de no alterar las concentraciones en el equilibrio,
- (v) el volumen de disolvente necesario para realizar las medidas puede ser importante,
- (vi) en el caso de los compuestos muy lipofílicos, se obtienen valores incorrectos debido a los efectos asociados a la formación de emulsiones de octanol en el agua,
- (vii) para estimar la concentración del soluto en cada fase, se precisa un método analítico, o en su defecto desarrollar uno nuevo.

Con el fin de solventar estos inconvenientes, se han propuesto métodos alternativos. Uno de ellos es el denominado método de agitación lenta (SSM, *low-stirring method*), desarrollado por Brooke *et al.* en 1986. En este método, ambas fases (agua y octanol) se agitan suavemente por balanceo para evitar la formación de emulsiones y obtener así un valor más real de  $\log P_{o/w}$  para los compuestos altamente lipofílicos. Con todo, es un método muy caro y lento [5].

Merece una mención especial una versión miniaturizada y automatizada del método del equilibrado de fases [6]. Para ello se utiliza un instrumento que consiste en una placa de extracción con 96 cavidades, en el que las manipulaciones se realizan con ayuda de un brazo robótico auxiliar. El proceso de distribución se realiza dentro de las cavidades. Una vez alcanzado el equilibrio y separadas las dos fases, sendas porciones se inyectan directamente en un sistema cromatográfico equipado con un inyector automático. Con este instrumento, se minimizan las etapas de manipulación de la muestra y se automatiza la transferencia de las fases al instrumento de medida. Los análisis de las fracciones se realizan mediante cromatografía líquida en fase inversa (RPLC, *reversed-phase liquid chromatography*), utilizando gradientes genéricos rápidos. De este modo, se minimiza considerablemente el tiempo de aplicación del método, puesto que no es necesario desarrollar un método específico para cada compuesto.

**b) Determinación potenciométrica**

La determinación potenciométrica fue establecida en el año 2000 por la OECD, como método estándar para estimar el  $\log P_{o/w}$  [7], y permite la medida de las constantes de ionización y los valores de  $\log P_{o/w}$  de solutos ionizables. El método se basa en la siguiente observación: cuando un compuesto de carácter ácido disuelto en la fase acuosa se valora en presencia de una fase orgánica, la curva de valoración se desplaza hacia valores de pH más básicos respecto a lo que se observaría en ausencia de la fase orgánica. Si el compuesto tuviera carácter básico, dicho desplazamiento sucedería en dirección opuesta (i.e. hacia valores de pH más ácidos). La magnitud del desplazamiento depende de los valores de  $pK_a$  (–logaritmo de la constante de disociación), de la lipofilia de las formas neutra y ionizada del soluto, y de la relación de volúmenes entre las dos fases [7,8].

En la práctica, la medida se lleva a cabo obteniendo en primer lugar el valor de  $pK_a$  del compuesto en agua pura. A continuación, se mide potenciométricamente el valor aparente ( $pK_a'$ ), en presencia de octanol. La diferencia entre ambos valores ( $\Delta pK_a$ ) se relaciona con el coeficiente de reparto octanol/agua mediante la siguiente ecuación:

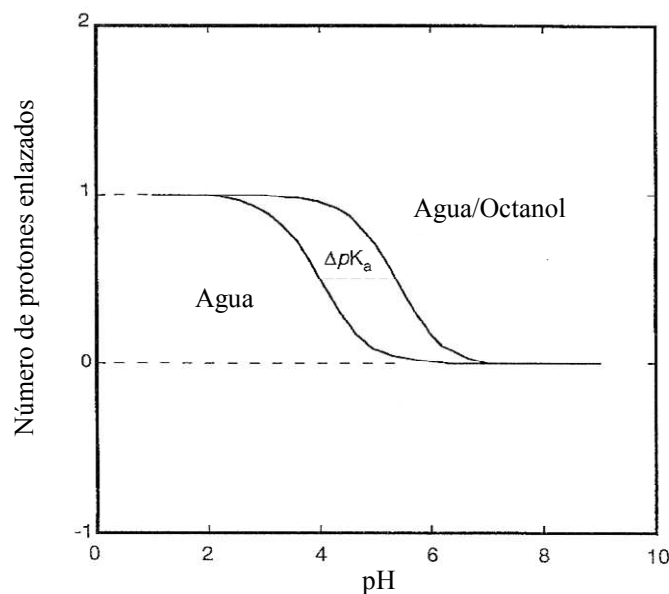
$$P_{o/w} = \frac{V_w (10^{\Delta pK_a} - 1)}{V_o} \quad (9.2)$$

donde  $V_w$  y  $V_o$  son los volúmenes de fase acuosa y octanólica, respectivamente, utilizados en la valoración. Cuando se representa la variación del número de protones enlazados frente al pH, la diferencia entre ambas curvas en el punto de inflexión corresponde a  $\Delta pK_a$  (Figura 9.1).

El método potenciométrico presenta el inconveniente de ofrecer resultados no siempre directamente interpretables. Al utilizar este método se asume que  $\log P^{BH^+}$  (i.e. el coeficiente de reparto del soluto en su forma protonada) es constante, pero en realidad éste depende de las condiciones experimentales, en particular de los volúmenes de las fases. Así, cuando  $P_{o/w}^B \gg P_{o/w}^{BH^+}$  (siendo  $P^B$  el coeficiente de reparto de la forma neutra), el valor de  $pK_a$  no dependerá de  $\log P_{o/w}^{BH^+}$ , y el método potenciométrico proporcionará valores correctos de  $\log P_{o/w}^B$ . Sin embargo, cuando  $P_{o/w}^{BH^+}$  no es despreciable frente a  $P_{o/w}^B$ ,



los resultados obtenidos a partir de las valoraciones potenciométricas deberán ser tomados con precaución [8].



**Figura 9.1.** Curvas de valoración y cálculo de  $\Delta pK_a$ .

Este método permite la estimación de valores de  $\log P_{o/w}$  en el intervalo  $-2$  a  $+7$ , pero no es aplicable cuando el compuesto presenta un carácter tensioactivo, o bien es fotosensible o volátil.

### ***c) Métodos cromatográficos para la estimación de $\log P_{o/w}$***

Razones de distinta índole han impulsado el desarrollo de métodos para la determinación cromatográfica de  $\log P_{o/w}$ :

- (i) En primer lugar, las desventajas propias del método del equilibrado de fases, que como se ha indicado, es lento y necesita de la cooperación de métodos analíticos apropiados, que permitan determinar la concentración de cada compuesto en ambas fases. El método potenciométrico, por otro lado, queda limitado a solutos ionizables.

- (ii) En segundo lugar, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) presenta una serie de ventajas intrínsecas muy interesantes: es una técnica universal, rápida, automatizable, con un bajo consumo de reactivos, precisa una cantidad pequeña de muestra, y evita la acción de las interferencias, precisamente por ser una técnica de separación.

Puesto que una fase enlazada químicamente es similar a una película de disolvente orgánico, debe existir algún tipo de relación entre la hidrofobicidad de un soluto y su factor de retención,  $k$ . Se han establecido diferentes métodos basados en esta relación, tanto en elución isocrática como en gradiente. Ahora bien, la gran mayoría de métodos desarrollados hasta ahora son sólo aplicables a familias de compuestos congéntricos (i.e. relacionados estructuralmente), de manera que poseen una utilidad restringida [3,9–13]. En general, se acepta que el metanol es mejor disolvente que el acetonitrilo en la determinación del coeficiente de reparto octanol/agua, puesto que no altera la capacidad de formar los enlaces de hidrógeno propios del agua y, además, durante el proceso de equilibrado se asocia con la fase estacionaria formando una monocapa capaz de formar enlaces de hidrógeno, simulando el efecto del octanol.

En la bibliografía aparecen estudios sobre los efectos originados por la adición de *n*-octanol a las fases móviles para simular mejor el proceso de reparto octanol/agua [14–16]. En general, con este aditivo se mejora la calidad de las predicciones, debido a la acción enmascarante del octanol sobre los grupos silanol libres, pero pueden aparecer problemas de sangrado de la columna. Además, es difícil establecer la cantidad de octanol que se debe añadir a la fase móvil.

### ***c1) $\log P_{o/w}$ a partir de $\log k_w$***

Una de las aproximaciones para la estimación del  $\log P_{o/w}$  se basa en la determinación del logaritmo del factor de retención en una fase móvil constituida por agua pura (i.e. 0% de modificador orgánico),  $\log k_w$ , y su posterior correlación con  $\log P_{o/w}$  [10,11,14–19]. Para ello, se realizan experiencias en las que se inyecta un conjunto de patrones (i.e. con  $\log P_{o/w}$  conocido) en fases móviles conteniendo diversas proporciones de disolvente orgánico, y se mide su tiempo de retención, junto con el correspondiente a los compuestos problema, que a ser posible deben ser estructuralmente similares a los

patrones. A continuación, se determina mediante extrapolación el valor de  $\log k_w$  para cada uno de los patrones y compuestos de interés, mediante la siguiente expresión:

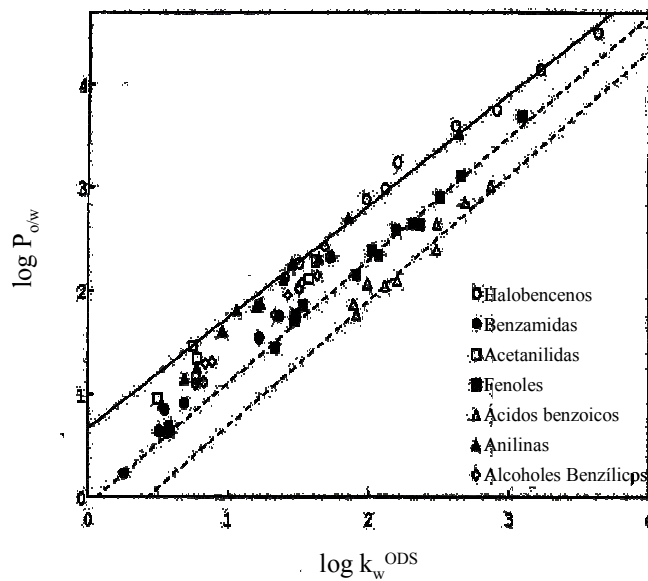
$$\log k = \log k_w - S \varphi \quad (9.3)$$

donde  $\varphi$  representa la fracción volumétrica de modificador orgánico en la fase móvil. Para calibrar el sistema, los valores de  $\log k_w$  obtenidos para los patrones se correlacionan con los respectivos valores de  $\log P_{o/w}$ , obteniéndose una recta. Los valores de  $\log P_{o/w}$  de los compuestos problema se obtienen por interpolación.

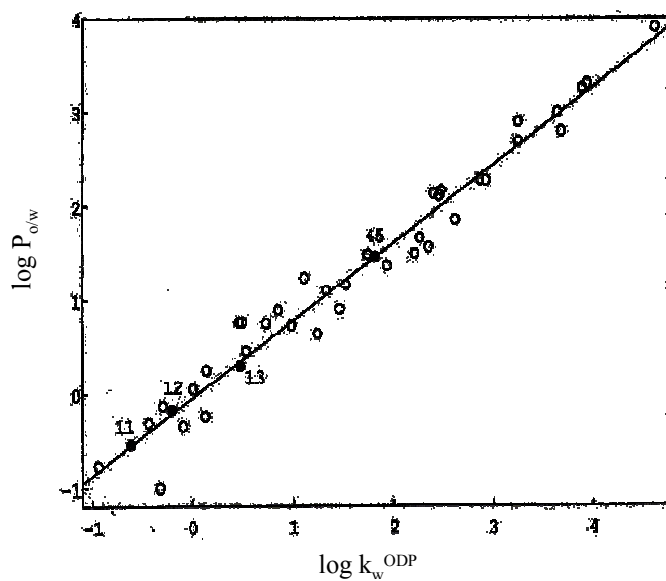
A pesar de que la Ecuación (9.3) implica que existe una relación lineal entre el logaritmo del factor de retención y el contenido de disolvente orgánico, en realidad esta relación no tiene por qué ser válida en todo el dominio de concentraciones de disolvente orgánico. Con todo, la relación lineal es una buena aproximación, siempre y cuando se opere dentro de los límites  $-0.5 < \log k < 1.5$ .

El principal inconveniente de esta metodología es la imprecisión asociada a la operación de extrapolación necesaria para obtener el valor de  $\log k_w$ : pequeñas variaciones en la pendiente de la recta pueden originar considerables variaciones en su valor. Además, cuando se utiliza metanol como disolvente orgánico, se observa una cierta curvatura a contenidos bajos del mismo.

En un artículo de Vallat *et al.* [20], aparecen dos ejemplos donde se relaciona linealmente  $\log P_{o/w}$  con el valor de  $\log k_w$ . En el primero se utiliza una columna de octadecilsilano y el valor de  $\log k_w$  se obtiene mediante extrapolación, y en el segundo, la columna es de octadecilpolivinilo y se obtiene de forma directa (i.e. trabajando con una fase móvil conteniendo un 100% de agua). Con el método de extrapolación (Figura 9.2) no se observó un comportamiento uniforme, sino que cada familia de solutos seguía una tendencia propia, de acuerdo a su grupo funcional. En el segundo caso (Figura 9.3), la correlación mejoró, debido a la reducción de las interacciones polares provocada por la ausencia de grupos silanol libres en la fase estacionaria.



**Figura 9.2.** Relación lineal entre  $\log P_{o/w}$  y el valor de  $\log k_w$  obtenido por extrapolación para una columna de octadecilsilano.



**Figura 9.3.** Relación lineal entre  $\log P_{o/w}$  y el valor de  $\log k_w$  obtenido por medida directa (i.e. trabajando con una fase móvil consistente en agua pura) para una columna de octadecilpolivinilo.

### **c2) $\log P_{o/w}$ obtenido mediante interpolación**

Otra metodología descrita en la bibliografía se basa en el cálculo de  $\log P_{o/w}$  mediante interpolación [3,9,21,22]. En este caso, se selecciona una serie de compuestos de referencia con  $\log P_{o/w}$  conocido para calibrar el sistema, y los datos de  $\log k$  versus  $\log P_{o/w}$  se ajustan a una recta, que debe incluir como mínimo seis puntos. Una vez conocida la retención de un nuevo soluto, se utiliza la función ajustada para predecir su valor de  $\log P_{o/w}$ . Este método fue incluido como procedimiento estándar por la OECD en el año 2004 [23].

Para aplicarlo, los compuestos de referencia deben tener valores de  $\log P_{o/w}$  próximos al esperado para el compuesto de interés, y es recomendable además que las estructuras moleculares sean similares. Por otro lado, deben evitarse las extrapolaciones. Naturalmente, los valores de  $\log P_{o/w}$  para los patrones utilizados en la calibración preferiblemente deben ser valores experimentales.

Finalmente, cabe señalar que, al igual que en los otros métodos, también aquí existen limitaciones. Así, no es aplicable a ácidos y bases fuertes, ni a complejos metálicos o solutos que puedan reaccionar con el eluyente, o agentes tensioactivos. Por supuesto, los compuestos ionizables deben hallarse en su forma neutra, añadiendo a sus disoluciones un tampón apropiado.

### **C3) $\log P_{o/w}$ a partir de modelos de solvatación**

Los modelos de solvatación se utilizan con frecuencia para calcular  $\log P_{o/w}$  [1,17,24–26]:

$$\log P_{o/w} = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (9.4)$$

Este tipo de relación es válida para predecir factores de retención y otras propiedades. El modelo se construye multiplicando una serie de términos que representan distintas propiedades del soluto (descriptores, indicados en mayúsculas), por las propiedades complementarias del sistema (en minúscula). Cada término del producto describe la contribución relativa de las interacciones intermoleculares a la propiedad correlacionada del soluto (e.g.  $\log k$  o  $\log P_{o/w}$ ). Los descriptores del soluto son el exceso de refracción molar ( $E$ ), la dipolaridad/polarizabilidad ( $S$ ), la acidez y basicidad efectivas del enlace de

hidrógeno ( $A$  y  $B$ ), y el volumen característico de McGowan ( $V$ ). El término  $eE$  indica la contribución de los electrones  $n$  y  $\pi$  a la polarizabilidad,  $sS$  las interacciones dipolares,  $aA$  y  $bB$  las interacciones por enlaces de hidrógeno, y  $\nu V$  se relaciona con la formación de la cavidad en la transferencia del soluto de una fase a la otra. Las constantes del sistema ( $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $\nu$ ) reflejan la diferencia en las propiedades de solvatación entre las dos fases. Tanto su signo como su magnitud son importantes para interpretar las propiedades del sistema. Se calculan mediante regresión lineal múltiple (Ecuación (9.4)), ajustando los datos de un grupo de solutos seleccionado de tal modo que se satisfaga los requisitos químicos y estadísticos del modelo.

Un sistema de separación emulará el sistema octanol/agua si las constantes del sistema para ambos procesos son prácticamente idénticas. La razón principal por la que la RPLC no consigue proporcionar modelos del todo adecuados para estimar  $\log P_{o/w}$  es que, aún dando lugar a interacciones intermoleculares similares, éstas no tienen el mismo carácter que las responsables del coeficiente de reparto octanol/agua. Las diferencias más notables radican en las interacciones por enlace de hidrógeno, ya que la acidez del soluto tiene un efecto considerable sobre  $\log k$ , pero ninguno sobre  $\log P_{o/w}$  [1,17,24].

Debe también mencionarse la existencia de métodos de cálculo de  $\log P_{o/w}$  basados en la correlación entre el valor de  $\log k$  cromatográfico y algunos descriptores moleculares, si bien con la limitación de estar desarrollados únicamente para familias de compuesto congenéricos. Este procedimiento se aplicó a fenoles [12] y derivados disustituídos del benceno [13]. En este último, se utilizó un modelo QSPR (*quantitative structure-property relationships*) para determinar  $\log P_{o/w}$  utilizando seis descriptores.

#### **c4) $\log P_{o/w}$ mediante cromatografía líquida micelar**

La cromatografía líquida micelar (CLM) es una variante de la RPLC donde se usa como fase móvil disoluciones acuosas o hidro-orgánicas conteniendo un tensioactivo en una proporción por encima de su concentración micelar crítica. En la mayoría de casos, se usa como tensioactivo el dodecilsulfato sódico o el bromuro de tetradeciltrimetilamonio.

En CLM, el factor de retención viene descrito por:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_0} + \left( \frac{K_{AM}}{k_0} \right) [M] \quad (9.5)$$

donde  $k_0$  es el factor de retención cuando la concentración de micelas es nula,  $K_{AM}$  es la constante de equilibrio soluto-micela y  $[M]$  la concentración de tensioactivo en la fase móvil (restada la concentración micelar crítica). Sin embargo, para estimar  $\log P_{o/w}$  y con otros fines, se utilizan fases móviles acuosas que contienen una pequeña cantidad de disolvente orgánico (e.g. acetonitrilo o propanol), que conduce a una mejora en las propiedades de transferencia de masa del sistema y reduce la retención.

En CLM, los gráficos de correlación entre  $k$  (o  $\log k$ ) y  $\log P_{o/w}$  son generalmente curvados, especialmente si se incluyen valores de  $\log P_{o/w}$  elevados. Las correlaciones parecen ser más correctas entre los valores de  $\log k_0$  y  $\log P_{o/w}$  [1,27]. Un inconveniente de esta técnica es que al adsorberse el tensioactivo en la fase estacionaria, éste puede actuar como intercambiador iónico, dando lugar a retenciones anómalas cuando se miden compuestos ionizables, lo que se traduce en una correlación pobre con  $\log P_{o/w}$  [28].

### **c5) $\log P_{o/w}$ mediante cromatografía en contracorriente**

La cromatografía en contracorriente (CCC, *counter-current chromatography*) es una técnica de cromatografía líquida en donde la fase estacionaria es también un líquido que se mantiene inmovilizado por efecto de la rotación. Se necesitan campos centrífugos para mantener estático el líquido de la fase estacionaria cuando la fase móvil fluye a través de ella. La separación del soluto se basa en el equilibrio de reparto entre las dos fases líquidas inmiscibles.

La CCC presenta la ventaja única de permitir el uso directo de fases estacionarias de octanol y fases móviles acuosas, o viceversa. De esta forma, se puede utilizar como método alternativo para determinar valores de  $\log P_{o/w}$ . Los tiempos de retención de los solutos inyectados son directamente proporcionales al valor de sus coeficientes  $P_{o/w}$ .

El empleo de esta técnica ofrece ventajas sobre la RPLC, ya que proporciona directamente el valor de  $P_{o/w}$  y no se requiere de ninguna etapa de calibración, ecuación de regresión y/o aproximación [22,29,30]. Además, permite obtener tanto los valores de  $P_{o/w}$  para la forma neutra, como para la forma ionizada. Pueden obtenerse valores de  $\log$

$P_{o/w}$  dentro de un intervalo de cinco unidades de magnitud ( $-2.5 < \log P_{o/w} < +2.5$ ), si bien debe señalarse que este intervalo puede resultar insuficiente cuando los compuestos son muy hidrofóbicos.

#### **d) Cálculos teóricos con programas comerciales**

Existen al menos 20 paquetes de software para estimar la lipofilia de un compuesto mediante cálculos teóricos, basados en la naturaleza del coeficiente de reparto [31]. Algunos de ellos son: ACD/log D, ADMET Predictor, Alog P, Bio-Loom, Chemaxon, HyperChem 7.0, KowWin 1.67 (EPI Suite Packaged), MlogP (DRAGIN 3.0 package), MOLPRO package, PrologD, SPARC, CSlogD y XlogP.

A pesar de que los resultados obtenidos concuerdan con los medidos directamente para compuestos neutros, estos programas tienden a ofrecer resultados inexactos cuando los compuestos incluyen grupos funcionales que interaccionan entre sí, o son moléculas complejas con fragmentos no disponibles en la base de datos. La mayoría de estos programas se han diseñado para estimar el coeficiente de reparto de la forma no ionizada de un compuesto, de modo que sus predicciones son pobres para compuestos zwitteriónicos, tautoméricos o cargados, así como para compuestos con gran tendencia a formar enlaces de hidrógeno. Con todo, los resultados son satisfactorios para los ácidos y bases débiles más comunes.

### **9.3. Fundamento teórico del método propuesto**

#### **9.3.1. El modelo de polaridad**

El método aquí propuesto para estimar  $\log P_{o/w}$  se basa en el modelo de polaridad desarrollado por Bosch *et al.* [26,32–35]. Este modelo se estableció con el fin de describir la retención cromatográfica de un soluto en función de parámetros sencillos que poseyeran un sentido físico claro.

En RPLC con mezclas binarias disolvente orgánico-agua, el comportamiento de retención puede ser descrito mediante [26,33]:



$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_2 \varphi^2 \quad (9.6)$$

donde  $c_{0-2}$  son parámetros de regresión que adoptan valores característicos para un determinado soluto y sistema separador (conjunto columna/disolvente). El término cuadrático puede eliminarse en intervalos moderados de contenido de disolvente orgánico, lo que da lugar a una relación lineal:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi \quad (9.7)$$

La Ecuación (9.6) (o su forma simplificada lineal) correlaciona el logaritmo del factor de retención ( $\log k$ ) con el contenido de modificador orgánico en la fase móvil. Se trata de modelos en principio empíricos, aunque se han reinterpretado también bajo perspectivas mecanicistas.

Johnson *et al.* demostraron que era posible establecer relaciones lineales entre  $\log k$  del soluto y el parámetro de polaridad de la fase móvil  $E_T$ , válidas en un amplio intervalo de composiciones de la fase móvil [32].  $E_T$  es el denominado parámetro de polaridad de Dimroth-Reichardt, que mide la polaridad y la acidez del enlace de hidrógeno del disolvente. Se demostró que se podían establecer relaciones lineales entre  $\log k$  y el parámetro normalizado  $E_T^N$  de la fase móvil:

$$\log k = q + p E_T^N \quad (9.8)$$

donde  $q$  y  $p$  son parámetros de ajuste.

Se observó que los parámetros  $q$  y  $p$  para una serie de solutos eluidos en la misma columna y fase móvil, se correlacionan linealmente [32], con lo que la Ecuación (9.8) puede reescribirse como:

$$\log k = (\log k)_0 + p(E_{Tm}^N - E_{Ts}^N) \quad (9.9)$$

donde  $E_{Ts}^N$  corresponde a la fase estacionaria y  $E_{Tm}^N$  a la fase móvil. La Ecuación (9.9) adopta la forma de una relación lineal con la energía libre (LFERs, *linear free energy relationships*), aplicada a la distribución de un soluto entre dos fases. De acuerdo con este formalismo, cualquier propiedad relacionada con la energía libre (e.g.  $\log k$ ) puede calcularse como la suma de un término constante ( $(\log k)_0$  en la Ecuación (9.9)) y diferentes términos de interacción soluto-disolvente, representados por el producto del parámetro de polaridad  $p$  propio del soluto y un parámetro del disolvente. En este caso, al existir una distribución entre dos fases, se expresa la diferencia entre los parámetros de

polaridad de la fase móvil y la fase estacionaria,  $(E_{Tm}^N - E_{Ts}^N)$ ;  $((\log k)_0$  y  $E_{Ts}^N$  son constantes que idealmente dependen sólo del sistema cromatográfico utilizado (columna y modificador orgánico), pero no del soluto ni de la composición de la fase móvil.

La Ecuación (9.9) posee el inconveniente de que no es aplicable en todo el intervalo de composiciones de la fase móvil. Así, por ejemplo, no es válida para fases móviles con un contenido superior al 80% de acetonitrilo o inferior al 30% de metanol. Para extender el intervalo de linealidad al dominio completo de contenidos de modificador orgánico, se ha propuesto un nuevo parámetro de polaridad normalizado,  $P_m^N$  [32]. En este caso:

$$\log k = (\log k)_0 + p(P_m^N - P_s^N) \quad (9.10)$$

donde  $p$  y  $P_m^N$  son descriptores asociados a la polaridad del soluto y de la fase móvil respectivamente, mientras que  $(\log k)_0$  y  $P_s^N$  son característicos del sistema cromatográfico. La Ecuación (9.10) se puede utilizar en todo el intervalo de composiciones de modificador orgánico (metanol o acetonitrilo) en la fase móvil (i.e. 0–100%).

El término  $(\log k)_0$  representa el factor de retención de un compuesto eluido en una fase móvil hipotética con la misma polaridad que la fase estacionaria ( $P_m^N = P_s^N$ );  $P_s^N$  describe las características de polaridad de la fase estacionaria, e incluye su hidrofobicidad, dipolaridad y tendencia a formar enlaces de hidrógeno. Puede adoptar valores positivos o negativos en caso de que la columna posea una polaridad distinta a la columna que se tomó como referencia para establecer la escala de valores de  $P_m^N$  (una columna Merck LiChrospher 100 RP-18, 100×5 mm) [26,32,33]. El parámetro  $P_m^N$  puede calcularse fácilmente a partir del porcentaje (en volumen) de modificador orgánico. Así, para fases móviles de acetonitrilo-agua [27,32,33]:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{2.13\varphi}{1 + 1.42\varphi} \quad (9.11)$$

y para fases móviles preparadas con mezclas de metanol-agua:

$$P_m^N = 1.00 - \frac{1.33\varphi}{1 + 0.47\varphi} \quad (9.12)$$

El logaritmo del factor de retención se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (9.13)$$

siendo  $t_R$  y  $t_0$  el tiempo de retención y el tiempo muerto, respectivamente. Como marcador del tiempo de muerto se utilizó KBr.

La polaridad del soluto,  $p$  (Ecuación (9.10)), depende de la naturaleza química del soluto y del sistema cromatográfico empleado. Sin embargo, se han observado correlaciones lineales aceptables entre los valores de  $p$  calculados para distintos sistemas [33,34]. De este modo, para una determinada columna, se puede establecer la siguiente relación lineal entre los parámetros  $p$  obtenidos con dos fases móviles cualesquiera, preparadas con distinto modificador orgánico (acetonitrilo y metanol):

$$p_{\text{MeCN}} = a' + b' p_{\text{MeOH}} \quad (9.14)$$

También se puede establecer una relación lineal para un mismo modificador orgánico y distintas columnas:

$$p_{\text{col1}} = a'' + b'' p_{\text{col2}} \quad (9.15)$$

y por lo tanto, entre dos columnas y dos disolventes diferentes:

$$p_{\text{col1,MeCN}} = a + b p_{\text{col2,MeOH}} \quad (9.16)$$

donde  $a$ ,  $a'$ ,  $a''$ ,  $b$ ,  $b'$  y  $b''$  son constantes características de los sistemas cromatográficos relacionados.

El sistema de referencia elegido fue una columna Spherisorb ODS-2 (100 mm × 5 mm) de Waters y fases móviles de acetonitrilo-agua, para el que como se describe en el siguiente apartado, se estableció el modelo QSPR utilizado aquí para la predicción de  $\log P_{\text{o/w}}$  [33,34].

### 9.3.2. El modelo QSPR

El método propuesto para estimar los valores de  $\log P_{o/w}$  utiliza un modelo de QSPR publicado anteriormente [36]. El modelo permite calcular el parámetro de polaridad de un soluto,  $p$ , a partir de cuatro descriptores derivados de la estructura del soluto y de su  $\log P_{o/w}$ . En este capítulo se propone calcular  $\log P_{o/w}$  de un soluto a partir de la medida cromatográfica de su parámetro de polaridad  $p$  y de los cuatro descriptores estructurales. Los descriptores del modelo se calcularon con CODESSA (*COmprehensive DEscriptors for Structural and Statistical Analysis*), que es un programa que proporciona hasta cinco clases de descriptores [37]:

- Constitucionales, que reflejan la composición elemental del compuesto (e.g. átomos y enlaces presentes, número de anillos aromáticos, peso molecular).
- Topológicos, que describen la conectividad de los átomos en la molécula (e.g. índice de Wiener, índices de Randic).
- Geométricos, que representan la estructura molecular del compuesto y se calculan a partir de la posición tridimensional de los átomos (e.g. momentos de inercia, volumen y área superficial moleculares).
- Electrostáticos, que contienen información relativa a la distribución de cargas en la molécula (e.g. parámetros de polaridad, cargas parciales máximas y mínimas).
- Químico-cuánticos, que se obtienen mediante cálculos realizados por el programa MOPAC (*Molecular Orbital PACkage*) incluido en CODESSA (e.g. momentos dipolares, energías del HOMO y del LUMO, *highest occupied molecular orbital* y *lowest unoccupied molecular orbital*).

Con el fin de establecer el modelo QSPR, se seleccionaron de esta amplia colección de descriptores, aquéllos que poseían una mejor correlación con el parámetro de polaridad  $p$ , evitando la inclusión de descriptores redundantes que dieran lugar a colinearidad. Uno de los parámetros sugeridos por CODESSA como descriptor en la predicción de  $p$  fue  $\log P_{o/w}$ , lo que no es de extrañar puesto que la retención cromatográfica se halla directamente relacionada con la hidrofobicidad de los solutos. En la Tabla 9.1 se indican los descriptores seleccionados para el modelo QSPR y su correlación con el parámetro de polaridad  $p$  para una columna Spherisorb ODS-2 y

mezclas de acetonitrilo-agua como fase móvil (sistema cromatográfico de referencia en nuestro estudio).

**Tabla 9.1.** Coeficientes del modelo QSPR que correlaciona el parámetro de polaridad del soluto,  $p$ , con cinco descriptores.<sup>a</sup>

Descriptor	Coeficiente	SD <sup>b</sup>
Término independiente	0.815	0.187
$\log P_{o/w}$	0.818	0.021
$\text{pol}/d^2$	-1.626	0.213
DPSA-1 (quantum)	$1.041 \cdot 10^{-3}$	$2.63 \cdot 10^{-4}$
Diferencia HOMO-LUMO	0.143	0.018
HDCA-2 (Zefirov)	-1.546	0.123
$R^2 = 0.964, n = 188, \text{SD} = 0.25$		

<sup>a</sup> El modelo se estableció con una columna Spherisorb ODS-2 y fases móviles de acetonitrilo-agua.

<sup>b</sup> SD = desviación estándar absoluta.

Además de  $\log P_{o/w}$ , el modelo de QSPR establecido contiene dos descriptores electrostáticos ( $\text{pol}/d^2$ , parámetro de polaridad/cuadrado de la distancia, y DPSA-1), un descriptor químico-cuántico (diferencia energética HOMO-LUMO) y un quinto descriptor que define las posibles interacciones intermoleculares por enlaces de hidrógeno (HDCA-2):

- $\text{pol}/d^2$  se obtiene como el cociente de la diferencia entre las cargas parciales máximas ( $q_{\max}$ ) y mínimas ( $q_{\min}$ ), y el cuadrado de la distancia que existe entre los átomos que las contienen.
- DPSA-1 está relacionado con el área superficial cargada (CPSA, *charged partial surface area*). Junto con  $\text{pol}/d^2$  contiene la información de la molécula

relacionada con las interacciones polares con otras moléculas. DPSA-1 es la diferencia entre el área superficial parcial positiva (PPSA-1) y la negativa (PNSA-1), que corresponden a la suma de las áreas superficiales de los átomos accesibles al disolvente, cargados positiva y negativamente. Las cargas se estiman mediante el programa MOPAC.

- HOMO-LUMO representa la diferencia de energía entre el último orbital molecular ocupado (HOMO) y el primer orbital desocupado (LUMO).
- HDCA-2 indica las posibles interacciones intermoleculares por enlaces de hidrógeno. Está relacionado con el área superficial parcial cargada (CPSA), y representa el área cargada por unidad de superficie de cualquier átomo dador de puentes de hidrógeno con una carga parcial positiva. Estas cargas se calculan con la aproximación de Zefirov.

En conclusión, este estudio QSPR demuestra que la polaridad de un soluto, definida mediante su parámetro de polaridad  $p$ , puede describirse mediante la combinación de  $\log P_{o/w}$  y cuatro descriptores calculados a partir de la estructura del soluto. En base a la misma relación, proponemos estimar  $\log P_{o/w}$  de un soluto a partir de la polaridad del mismo y del valor de los cuatro descriptores estructurales seleccionados:

$$\log P_{o/w} = 1.222 p + 1.889(\text{HDCA} - 2) - 0.174(\text{HOMO} - \text{LUMO}) + 1.987(\text{pol/d}^2) - 1.27 \cdot 10^{-3} (\text{DPSA} - 1) - 0.996 \quad (9.17)$$

Para ello, se obtuvo el parámetro de polaridad  $p$  para un grupo de solutos de diversa naturaleza, cromatografiados con columnas previamente caracterizadas, es decir, columnas para las que se conocían los valores de  $(\log k)_0$  y  $P_s^N$ . Puesto que el modelo QSPR (Tabla (9.1)), se estableció con otro sistema cromatográfico (Spherisorb ODS-2 y acetonitrilo como modificador orgánico) [36], los valores de  $p$  para cada soluto tuvieron que ser transferidos a dicho sistema. Dicha transferencia se realizó mediante relaciones lineales sencillas (Ecuaciones (9.15) y (9.16)).

## 9.4. Parte experimental

### 9.4.1. Reactivos

Las fases móviles se prepararon con metanol y acetonitrilo de calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania). Para garantizar que los solutos se encontraban en la forma neutra, se midió su retención a pH 3 ó 6 (dependiendo de su  $pK_a$ ). Las fases móviles a pH 3 se tamponaron con mezclas apropiadas de ácido cítrico 0.1 M (Carlo Erba, Milán, Italia) y NaOH 1 M (Merck). Para preparar las fases móviles amortiguadas a pH 6 se utilizó ácido acético 0.01 M y acetato sódico (Baker, Denventer, Holanda). Se utilizó agua ultrapura durante todo el proceso experimental, generada con un sistema Milli-Q plus (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.).

Los compuestos incluidos en este trabajo, que proceden de los siguientes fabricantes: Aldrich (Steinheim, Alemania), Fluka (Buchs, Suiza), Merck, Carlo Erba, Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), Baker, Panreac (Barcelona), Riedel de Haën (Seelze, Alemania), Astra-Zéneca (Madrid), Normapur (Briare, Francia), Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.), Doesder (Barcelona) y Avocado (Lancashire, Inglaterra), se muestran en la Tabla 9.2. Flurbiprofeno, ketoprofeno y naproxeno proceden de productos farmacéuticos comerciales.

También se estudiaron los siguientes compuestos de nueva síntesis (Tabla 9.3): 1-acetil-2-isonicotinoil-hidrazina, 2-(benziltio)-1H-benzo[d]imidazol, 4-metilciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina, 1-decanoil-2-isonicotinoil-hidrazina, isoniniazida, ciclopentanona-isonicotinoil-hidrazina, 2-(benzidriltio)-1H-benzo[d]imidazol, 2-(3,5-dinitrobenziltio)-1H-benzo-[d]imidazol, 2-(2-ciclohexiletio)-1H-benzo[d]imidazol, 1-benzil-2-(benziltio)-1H-benzo[d]imi-dazol, ciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina, 1-etil-2-(etiltio)-1H-benzo[d]imidazol, que poseen actividad antituberculosa.

Las disoluciones madre de los compuestos estudiados se prepararon en metanol en concentración de  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ . La concentración de las disoluciones de medida fue  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Con el fin de evitar posibles efectos debidos a la diferente fuerza eluotrópica de los disolventes, para preparar las disoluciones se utilizó el mismo disolvente de la fase móvil (acetonitrilo o metanol).

**Tabla 9.2.** Valores de referencia experimentales de  $\log P_{o/w}$  y descriptores moleculares para los solutos estudiados.

Compuesto	CAS	$\log P_{o/w}$	Descriptores moleculares			
			pol/d <sup>2</sup>	HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1
1,2,4-Trimetilbenceno	95-63-6	3.63	0.01	0.00	9.48	193.12
1,2-Dihidroxibenceno	120-80-9	0.88	0.02	0.82	9.18	11.95
1,3-Dihidroxibenceno	108-46-3	0.80	0.01	0.84	9.37	23.84
1,4-Dihidroxibenceno	123-31-9	0.59	0.01	0.83	8.94	26.03
1,4-Dimetilbenceno	106-42-3	3.15	0.00	0.00	9.55	149.12
1-Acetil-2-isonicotinoil-hidrazina	*	-0.87	0.01	0.94	9.81	16.99
1-Decanoil-2-isonicotinoil-hidrazina	*	3.66	0.01	0.86	9.81	312.79
1-Etil-2-etilitio-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol	*	3.36	0.07	0.26	8.12	198.45
1-Feniletilamina	618-36-0	1.41	0.17	0.22	9.95	162.03
Ácido 1-naftoico	86-55-5	3.10	0.26	0.52	8.21	10.10
2-(2-Ciclohexiletilitio)-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol	*	4.94	0.16	0.36	8.17	289.87
2-(3,5-Dinitrobenziltio)-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol	*	3.42	0.16	0.50	6.82	-9.31
2,3-Dimetilfenol	526-75-0	2.48	0.28	0.33	9.32	114.15
2,4,6-Triclorofenol	88-06-2	3.69	0.27	0.36	8.89	182.57
2,4-Diclorofenol	120-83-2	3.06	0.27	0.35	9.03	135.21
2,4-Dimetilfenol	105-67-9	2.30	0.28	0.43	9.21	143.56
2,6-Diclorofenol	87-65-0	2.75	0.27	0.40	9.11	12.98
2,6-Dimetilanilina	87-62-7	1.84	0.16	0.19	8.95	161.05
2-Aminopiridina	504-29-0	0.49	0.16	0.49	9.16	50.77

(\*) Fármacos de nueva síntesis con actividad antituberculosa.



**Tabla 9.2** (continuación).

Compuesto	CAS	log $P_{ow}$	pol/d <sup>2</sup>	Descriptores moleculares		
				HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1
2-Benzidiltio-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol	*	4.90	0.16	0.34	7.84	147.54
2-Benziltio-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol	*	3.92	0.16	0.47	8.21	110.99
2-Bromofenol	95-56-7	2.35	0.27	0.43	9.23	101.12
2-Clorofenol	95-57-8	2.67	0.27	0.44	9.26	95.74
2-Metilanilina	95-53-4	1.32	0.17	0.18	9.03	124.52
2-Naftol	135-19-3	2.70	0.03	0.40	8.22	30.99
2-Nitroanilina	88-74-4	1.85	0.16	0.24	8.27	24.76
2-Nitroanisol	91-23-6	1.73	0.04	0.00	8.86	49.05
3,4-Dicloroanilina	95-76-1	2.69	0.01	0.23	8.74	170.81
3,5-Diclorofenol	591-35-5	2.60	0.27	0.43	9.25	-135.33
Ácido 3-bromobenzoico	585-76-2	2.86	0.26	0.51	9.23	63.92
3-Cloroanilina	108-42-9	1.88	0.16	0.24	8.99	-6.43
Ácido 3-metilbenzoico	99-04-7	2.37	0.26	0.50	9.32	40.63
3-Metilfenol	108-39-4	1.96	0.28	0.43	9.41	90.08
3-Nitroanilina	99-09-2	1.37	0.16	0.23	8.31	13.80
3-Nitrofenol	554-84-7	2.00	0.27	0.42	8.80	-20.10
4-Acetaminofenol	103-90-2	0.46	0.28	0.79	8.75	67.72
4-Aminopiridina	504-24-5	0.26	0.17	0.46	9.44	43.65
4-Cloroacetanilida	539-03-7	2.12	0.02	0.33	8.82	0.95

(\*) Fármacos de nueva síntesis con actividad antituberculosa.

**Tabla 9.2** (continuación).

Compuesto	CAS	log $P_{ow}$	Descriptores moleculares			
			pol/d <sup>2</sup>	HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1
4-Cloroanilina	106-47-8	1.83	0.17	0.23	8.79	-7.62
4-Clorofenol	106-48-9	2.39	0.28	0.41	9.22	-47.12
4-Iodofenol	540-38-5	2.90	0.28	0.41	9.27	114.48
4-Hidroxibenzoato de metilo	93-58-3	1.96	0.28	0.41	9.14	17.61
4-Hidroxibenzoato de propilo	2315-68-6	3.04	0.28	0.40	9.14	128.31
4-Metilciclohexanona-isonicotinil-hidrazina	*	0.63	0.11	0.51	8.75	179.58
4-Nitroanilina	100-01-6	1.39	0.17	0.23	8.48	16.09
4-Nitrotolueno	99-99-0	2.37	0.02	0.00	9.26	35.88
5-Hidroxi flavona	491-78-1	4.30	0.27	0.25	8.38	-35.27
Acetanilida	103-84-4	1.16	0.02	0.34	9.09	101.14
Acetofenona	98-86-2	1.58	0.11	0.10	9.58	52.26
Aldrin	309-00-2	6.50	0.02	0.00	9.49	33.58
Anilina	62-53-3	0.90	0.17	0.22	8.97	81.48
Antipirina	60-80-0	0.38	0.12	0.33	8.56	138.23
Antraceno	120-12-7	4.46	0.00	0.00	7.28	34.24
$\alpha$ -Pino	2437-95-8	4.86	0.00	0.00	10.30	299.55
Benzaldehido	100-52-7	1.48	0.04	0.24	9.57	24.89
Benzamida	55-21-0	0.64	0.11	0.51	9.73	25.85
Benceno	71-43-2	2.13	0.00	0.00	10.20	51.14

(\*) Fármacos de nueva síntesis con actividad antituberculosa.

**Tabla 9.2** (continuación).

Compuesto	CAS	$\log P_{ow}$	Descriptores moleculares			
			$\text{pol/d}^2$	HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1
Benzofurano	132-64-9	4.12	0.05	0.00	8.95	23.51
Ácido Benzoico	65-85-0	1.96	0.26	0.51	9.62	-14.06
Benzonitrilo	100-47-0	1.56	0.07	0.00	9.63	-54.82
Benzofenona	119-61-9	3.18	0.11	0.00	9.44	36.98
Benzoato de benzilo	120-51-4	3.97	0.13	0.00	9.06	45.98
Benzoato de metilo	93-58-3	2.12	0.13	0.00	9.64	27.24
Bifenilo	92-52-4	4.01	0.00	0.00	8.55	27.34
Bromobenceno	108-86-1	2.99	0.01	0.00	9.66	110.11
Butilbenceno	104-51-8	4.38	0.00	0.00	9.83	200.53
Butirofenona	495-40-9	2.77	0.11	0.09	9.58	141.07
Cafeína	58-08-2	-0.07	0.01	0.77	8.62	119.87
Clorobenceno	108-90-7	2.89	0.05	0.00	9.72	-34.53
Criseno	218-01-9	5.73	0.00	0.00	7.70	11.05
Corticosterona	50-22-6	1.94	0.00	1.22	10.04	308.73
Cortisona	53-06-5	1.47	0.01	1.13	9.97	198.18
Ciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina	*	0.27	0.11	0.59	9.27	166.60
Ciclopentanona-isonicotinoil-hidrazina	*	-0.62	0.11	0.59	9.47	151.79
Difenhidramina	58-73-1	3.27	0.05	0.10	9.50	250.24
Estradiol	57-91-0	4.01	0.00	0.82	9.24	286.52

(\*) Fármacos de nueva síntesis con actividad antituberculosa.

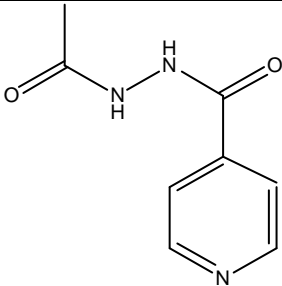
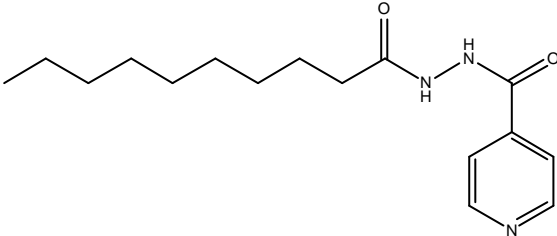
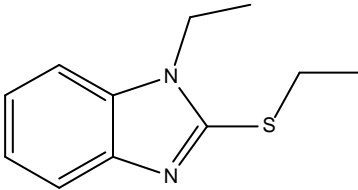
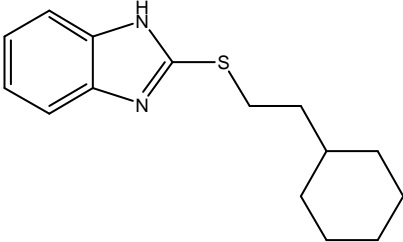
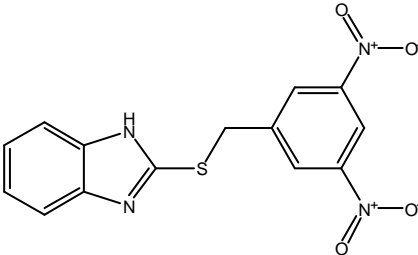
**Tabla 9.2** (continuación).

Compuesto	CAS	$\log P_{ow}$	$\text{pol/d}^2$	Descriptores moleculares			
				HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1	
Estriol	50-27-1	2.45	0.00	1.21	9.25	260.37	
Etilbenceno	100-41-4	3.15	0.00	0.00	9.84	141.52	
Fenantreno	85-01-8	4.46	0.00	0.00	8.21	12.83	
Feniltiourea	103-85-5	0.73	0.03	0.43	8.24	16.33	
Fenol	108-95-2	1.46	0.28	0.41	9.51	40.89	
Flurbiprofeno	5104-49-4	4.16	0.00	0.51	8.59	58.31	
Furano	110-00-9	1.34	0.05	0.00	10.04	-19.00	
Hexaclorobenceno	118-74-1	5.73	0.01	0.00	8.87	298.14	
Hexilbenceno	1077-16-3	5.52	0.01	0.00	9.83	264.81	
Hidrocortisona	50-23-7	1.61	0.02	1.27	9.94	235.98	
Ibuprofeno	15687-27-1	3.97	0.26	0.53	9.59	212.51	
Isoniazida	54-85-3	-0.65	0.11	0.93	9.83	36.44	
Isonicotinamida	1453-82-3	-0.28	0.11	0.52	9.71	-14.43	
Ketoprofeno	22071-15-4	3.14	0.26	0.63	9.28	65.01	
Lidocaína	137-58-6	2.26	0.03	0.37	9.13	267.67	
Maprotilina	10262-69-8	2.85	0.17	0.19	9.59	290.70	
Metoxibenceno	100-66-3	2.11	0.05	0.00	9.49	95.56	
Metoxurón	19937-59-8	1.64	0.01	0.48	8.61	247.92	
Monurón	150-68-5	1.94	0.11	0.37	8.85	49.58	
Mirceno	123-35-3	4.17	0.00	0.00	9.70	226.81	

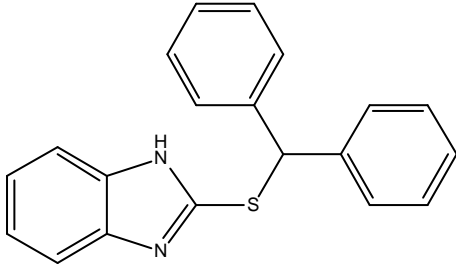
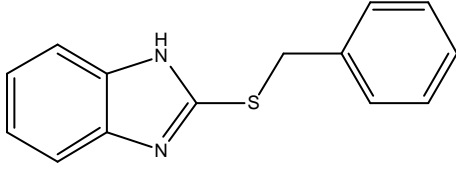
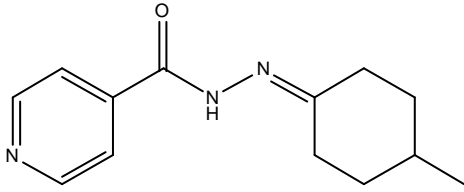
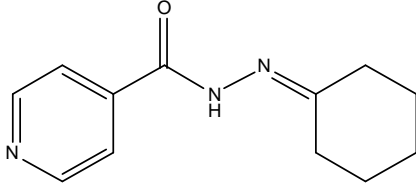
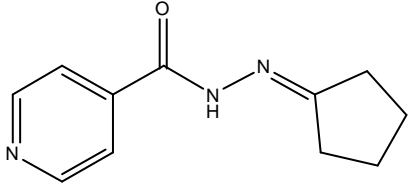
**Tabla 9.2** (continuación).

Compuesto	Descriptores moleculares					
	CAS	$\log P_{o/w}$	$\text{pol/d}^2$	HDCA-2	HOMO-LUMO	DPSA-1
Naftaleno	91-20-3	3.28	0.00	0.00	8.45	44.33
Naproxeno	22204-53-1	3.34	0.00	0.84	8.25	169.98
<i>N</i> -Etilanilina	103-69-5	2.16	0.16	0.18	9.02	167.81
Nitrobenceno	98-95-3	1.85	0.02	0.00	9.49	-7.46
Nortriptilina	72-69-5	4.92	0.17	0.19	9.00	286.01
Pentaclorofenol	87-86-5	5.12	0.26	0.40	8.60	252.37
Pireno	129-00-0	4.88	0.00	0.00	7.24	5.61
Pirimidina	289-95-2	-0.40	0.03	0.00	10.34	-10.43
Pirrol	109-97-7	0.75	0.17	0.24	10.03	51.39
Procainamida	51-06-9	0.88	0.01	0.73	8.80	269.33
Propanolol	525-66-6	3.48	0.05	0.45	8.28	236.44
Propilbenceno	103-65-1	3.72	0.00	0.00	9.83	171.48
Propiofenona	93-55-0	2.19	0.11	0.10	9.58	110.56
Quinolina	91-22-5	2.03	0.03	0.00	8.72	22.26
Timol	89-83-8	3.30	0.28	0.20	9.27	198.15
Tiourea	62-56-6	-1.02	0.02	0.50	8.85	-14.19
Tolueno	108-88-3	2.73	0.01	0.00	9.85	100.42
Trazodona	19794-93-5	2.82	0.01	0.50	7.97	175.36
Warfarin	81-81-2	3.25	0.02	0.40	8.21	87.91

**Tabla 9.3.** Estructura de los compuestos de nueva síntesis con actividad antituberculosa.

Compuesto	Estructura
1-Acetil-2-isonicotinoil-hidrazina	
1-Decanoil-isonicotinoil-hidrazina	
1-Etil-2-etiltio-1H-benzo[d]imidazol	
2-(2-Ciclohexiltio)-1H-benzo[d]imidazol	
2-(3,5-Dinitrobenziltio)-1H-benzo[d]imidazol	

**Tabla 9.3** (continuación).

Compuesto	Estructura
2-Benzidriltio-1H-benzo[d]imidazol	
2-Benziltio-1H-benzo[d]imidazol	
4-Metilciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina	
Ciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina	
Ciclopentanona-isonicotinoil-hidrazina	

Tanto las fases móviles como las disoluciones de medida se filtraron través de membranas de nylon (Osmonics, Herental, Bélgica), con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , y un diámetro de 47 mm (Magna) y 17 mm (Cameo), respectivamente. Además, las fases móviles se desgasificaron con una corriente de helio saturada en el modificador orgánico correspondiente.

Las columnas utilizadas fueron las siguientes: Luna C18 (2) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) y Chromolith Performance RP-18e, protegida por una precolumna Chromolith RP-18e (5×4.6 mm), ambas de Merck. Las características de ambas columnas proporcionadas por el fabricante se muestran en la Tabla 9.4.

**Tabla 9.4.** Características de las columnas utilizadas en este estudio.

Características	Luna C18	Chromolith
Estructura	Particulada	Monolítica
Diámetro de partícula ( $\mu\text{m}$ )	5	—
Porosidad total (%)	—	—
Diámetro promedio de los poros ( $\text{\AA}$ )	110	—
Tamaño macroporos ( $\mu\text{m}$ )	—	2
Tamaño mesoporos ( $\text{\AA}$ )	—	130
Área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	372	300
Volumen poros ( $\text{ml g}^{-1}$ )	—	1
Carbono total	18.1%	18%
Protección	Sí	Sí
Longitud (mm)	150	100
Diámetro (mm)	4.6	4.6
Intervalo de pH	1.5–10	2–7.5



La composición de las fases móviles de acetonitrilo y metanol se situó en el intervalo 20–60% (v/v) para la columna Luna C18, y 30–70% para la Chromolith. El intervalo de composiciones utilizado para cada compuesto dependió de su hidrofobicidad.

### 9.4.2. Preparación de las fases móviles tamponadas

El método de polaridad utilizado en este trabajo requiere que los solutos se hallen en su forma neutra. Pero como es bien sabido, el pH de la fase móvil (y el  $pK_a$  de los solutos) se modifican al añadir un modificador orgánico al tampón acuoso. Se consideraron unas investigaciones previas publicadas en la Ref. [38], para garantizar que los solutos se encontraban en efecto en su forma neutra al pH de la fase móvil. El electrodo se calibró con tampones acuosos, mientras que la medida del pH en las fases móviles se realizó tras la adición del modificador orgánico a la disolución tampón. Así, los valores medidos corresponden a la escala  $^s pH$ .

Para conocer si el soluto se encuentra ionizado o en su forma neutra en la fase móvil, el valor de  $^s pK_a$  se compara con el valor de pH para la fase móvil ( $^s pH$ ). Para estimar el valor de  $^s pK_a$ , se utilizó la siguiente relación:

$$^s pK_a = a_s {}^w pK_a + b_s + \delta \quad (9.18)$$

donde  $a_s$  y  $b_s$  son constantes que dependen del grupo funcional presente en la molécula del soluto (e.g. piridinas, aminas, ácidos carboxílicos aromáticos, ácidos carboxílicos alifáticos y fenoles), y de la naturaleza y contenido del modificador orgánico en la fase móvil;  $\delta$  es un término de corrección que incluye el efecto primario del medio y la diferencia que existe entre el potencial de unión líquida en la fase móvil hidro-orgánica y en agua, en el sistema del electrodo.

Las constantes  $a_s$  y  $b_s$  se calculan a partir de las ecuaciones propuestas por Rosés *et al.* [39,40] y Espinosa *et al.* [41]:

$$a_s = \frac{1 + a_{s1} \varphi + a_{s2} \varphi^2}{1 + a_{s3} \varphi + a_{s4} \varphi^2} \quad (9.19)$$

$$b_s = \frac{b_{s1} \varphi + b_{s2} \varphi^2}{1 + b_{s3} \varphi + b_{s4} \varphi^2} \quad (9.20)$$

donde  $a_{s1}$ ,  $a_{s2}$ ,  $a_{s3}$ ,  $a_{s4}$ ,  $b_{s1}$ ,  $b_{s2}$ ,  $b_{s3}$  y  $b_{s4}$  son parámetros de ajuste para todas las formas ácidas de una misma familia. Los valores de  $a_{si}$  y  $b_{si}$  para algunas familias de compuestos se indican en la Tablas 9.5 y 9.6 para acetonitrilo y metanol, respectivamente.

El término  $\delta$  depende de la naturaleza y contenido del modificador orgánico y se puede obtener a partir de las siguientes expresiones empíricas [38]:

$$\delta = \frac{-0.446\varphi_{\text{MeCN}}^2}{1 - 1.316\varphi_{\text{MeCN}} + 0.433\varphi_{\text{MeCN}}^2} \quad (9.21)$$

para mezclas de acetonitrilo-agua, y

$$\delta = \frac{0.09\varphi_{\text{MeOH}} - 0.11\varphi_{\text{MeOH}}^2}{1 - 3.15\varphi_{\text{MeOH}} + 3.51\varphi_{\text{MeOH}}^2 - 1.35\varphi_{\text{MeOH}}^3} \quad (9.22)$$

para mezclas de metanol-agua. En estas expresiones,  $\varphi_{\text{MeCN}}$  y  $\varphi_{\text{MeOH}}$  representan los contenidos de acetonitrilo y metanol en la fase móvil, respectivamente, expresados como fracción volumétrica (v/v).

### 9.4.3. Instrumentación

El sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japón) estaba equipado con dos bombas isocráticas LC-10ADvp, un inyector automático SIL-20AC-HT, un horno CTO-10ASvp, un detector de fila de diodos SPD-M10a vp, y un controlador SCL-10Avp. La temperatura de las columnas se fijó a 25°C. Se realizó un barrido de longitudes de onda desde 190 hasta 800 nm, y las señales se monitorizaron en el máximo de absorción de cada compuesto.

El flujo fue de 1 ml min<sup>-1</sup> para la columna Luna C18 y de 2 ml min<sup>-1</sup> para la Chromolith. El volumen de inyección fue en todos los casos de 10 µl, y se realizaron inyecciones por triplicado. Se utilizó una disolución de KBr en concentración de 0.1 µg ml<sup>-1</sup> como marcador del tiempo muerto.

El pH se midió con un potenciómetro equipado con un electrodo combinado de Ag<sup>+</sup>/AgCl/vidrio (Crison Model GPL 22, Alella, Barcelona).

**Tabla 9.5.** Parámetros utilizados en las Ecuaciones (9.19) y (9.20) para la predicción de la pendiente ( $a_s$ ) y ordenada en el origen ( $b_s$ ) de la correlación lineal entre los valores de  ${}^s\text{p}K_a$  (mezclas de acetonitrilo-agua) y  ${}^w\text{p}K_a$  (Ecuación (9.18)) [38].

Familia de compuestos	$a_{s1}$	$a_{s2}$	$a_{s3}$	$a_{s4}$
Ácidos carboxílicos alifáticos	9.97	-8.59	8.83	-8.72
Ácidos carboxílicos aromáticos	52.04	-10.93	49.33	-32.69
Fenoles	10.05	-10.04	7.97	-8.37
Aminas	-0.73	-0.27	-0.87	-0.12
Piridinas	-1.67	0.67	-1.66	0.67
Familia de compuestos	$b_{s1}$	$b_{s2}$	$b_{s3}$	$b_{s4}$
Ácidos carboxílicos alifáticos	-0.68	9.94	8.45	-8.59
Ácidos carboxílicos aromáticos	-5.32	8.99	22.56	-23.21
Fenoles	-5.33	9.95	0.19	-0.70
Aminas	-1.82	2.25	-1.75	0.90
Piridinas	-1.78	1.89	-0.58	-0.40

**Tabla 9.6.** Parámetros utilizados en las Ecuaciones (9.19) y (9.20) para la predicción de la pendiente ( $a_s$ ) y ordenada en el origen ( $b_s$ ) de la correlación lineal entre los valores de  ${}^s\text{p}K_a$  (mezclas de metanol-agua) y  ${}^w\text{p}K_a$  (Ecuación (9.18)) [38].

Familia de compuestos	$a_{s1}$	$a_{s2}$	$a_{s3}$	$a_{s4}$
Fenoles	-0.656	-0.030	-0.844	0.133
Ácidos carboxílicos alifáticos	-1.406	0.680	-1.551	0.827
Ácidos carboxílicos aromáticos				
con sustituyentes en orto-	-1.189	0.190	-1.424	0.425
sin sustituyentes en orto-	-1.101	0.103	-1.516	0.518
Aminas	-0.476	0.209	-0.400	0.158
Piridinas	2.617	0.000	2.809	0.000
Familia de compuestos	$b_{s1}$	$b_{s2}$	$b_{s3}$	$b_{s4}$
Fenoles	-0.454	0.866	-0.017	-0.865
Ácidos carboxílicos alifáticos	1.034	-0.898	-1.250	0.277
Ácidos carboxílicos aromáticos				
con sustituyentes en orto-	0.449	-0.429	-1.674	0.677
sin sustituyentes en orto-	-0.178	0.187	-1.699	0.702
Aminas	-0.458	0.477	-1.674	0.690
Piridinas	-1.733	1.763	-1.214	0.272

## 9.5. Resultados y discusión

### 9.5.1. Obtención de los descriptores estructurales

El proceso de cálculo de los descriptores estructurales se inicia con el dibujo de la molécula del compuesto con el programa HyperChem Lite (HyperCube, Gainesville, FL, EE.UU.). Este programa es capaz de realizar una optimización geométrica de la molécula y de preparar la exportación de la información en ficheros con un formato adecuado para su procesamiento con MOPAC (se utilizó la versión 6.0) [42]. MOPAC es un programa semiempírico de química cuántica, basado en la aproximación NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), que se utiliza para la predicción de propiedades químicas y la modelización de reacciones químicas. A continuación, con la ayuda del programa AuxQSPR, se realiza la optimización geométrica definitiva con el método de cálculo semiempírico AM1. Se optimizaron todas las geometrías sin restricciones de simetría. El objetivo era obtener la geometría óptima correspondiente a un mínimo real de energía. Con los ficheros obtenidos, se procedió al cálculo de los descriptores mediante el programa CODESSA [37].

En la Tabla 9.2 se enumeran los compuestos estudiados y se proporciona para cada uno de ellos el número CAS, junto con los valores de  $\log P_{o/w}$  y de los cuatro descriptores moleculares incluidos en el modelo QSPR (Ecuación (9.17)). Los valores de  $\log P_{o/w}$  indicados en la tabla son valores experimentales que figuran en la base de datos de Leo, Hoekman y Hansch [43], o medidos experimentalmente en el laboratorio donde se realizó este trabajo. Así, para comprobar la calidad de las estimaciones de  $\log P_{o/w}$  realizadas según el método propuesto, en ningún caso se ha hecho uso de valores estimados con un programa de cálculo, ya que para compuestos con una cierta complejidad molecular los diferentes programas comerciales pueden proporcionar valores muy distintos (i.e. en la mayoría de casos significativamente sesgados).

### **9.5.2. Transferencia de los valores de $p$ al sistema de referencia**

Como se ha comentado, la predicción de  $\log P_{o/w}$  mediante la Ecuación (9.17) requiere que los valores de  $p$  de cada soluto en los sistemas cromatográficos utilizados se transfieran al sistema de referencia (columna Spherisorb ODS-2 / acetonitrilo), debido a que el modelo QSPR se estableció con este sistema. Para ello, se hizo uso de las Ecuaciones (9.15) y (9.16). Los coeficientes  $a''$  ( $a$ ) y  $b''$  ( $b$ ) de dichas ecuaciones se ajustaron a partir de una colección de valores de  $p$  para 12 compuestos seleccionados (ver Tablas 9.7 y 9.8), que se midieron con el sistema de referencia [34] y con las columnas Luna C18 y Chromolith, utilizando para éstas últimas los dos modificadores (acetonitrilo y metanol).

En el grupo de 12 compuestos seleccionados aparecen representados solutos de polaridad diversa, distribuidos homogéneamente a lo largo de todo el intervalo de valores de  $p$ , conteniendo diferentes grupos funcionales. Además, se han incluido compuestos altamente hidrofóbicos ( $p > 5$ ) para mejorar las predicciones para este tipo de compuestos. Todos los compuestos seleccionados son de uso común en los laboratorios.

En las Tablas 9.7 y 9.8 se muestran los parámetros ( $(\log k)_0$  y  $P_s^N$ ) de los sistemas cromatográficos estudiados para acetonitrilo y metanol, respectivamente. Además, en la Tabla 9.7 aparecen los parámetros para el sistema de referencia. En ambas tablas, también se incluyen los valores de  $p$  de los 12 compuestos seleccionados, que permitieron establecer las ecuaciones de transferencia [34]. En la Tabla 9.9 se muestran los parámetros de las rectas de transferencia.

**Tabla 9.7.** Parámetros de polaridad de las columnas y de los 12 compuestos utilizados en la transferencia entre sistemas con acetonitrilo como modificador orgánico.

	Spherisorb ODS-2	Luna C18	Chromolith
$P_s^N$	0.00	-0.04	-0.06
$(\log k)_0$	-0.90	-0.83	-1.49
$P$			
1,2-Dihidroxibenceno	1.63	1.79	1.84
Benzamida	1.47	1.68	1.65
3-Metilfenol	2.75	2.72	2.85
Propiofenona	3.62	3.38	3.54
Benzoato de metilo	3.54	3.30	3.46
4-Nitrotolueno	3.97	3.67	3.83
Butirofenona	4.18	3.89	4.09
Naftaleno	—	4.38	4.66
Propilbenceno	5.55	5.01	5.28
Heptanofenona	5.96	5.36	5.69
Butilbenceno	6.17	5.51	5.81
Criseno	—	—	6.52

**Tabla 9.8.** Parámetros de polaridad de las columnas y de los 12 compuestos utilizados en la transferencia entre sistemas con metanol como modificador orgánico.

	Luna C18	Chromolith
$P_s^N$	-0.06	-0.12
$(\log k)_0$	-1.03	-1.76
$p$		
1,2-Dihidroxibenceno	1.87	2.05
Benzamida	1.98	2.07
3-Metilfenol	2.91	3.05
Propiofenona	3.51	3.63
Benzoato de metilo	3.55	3.63
4-Nitrotolueno	3.69	3.76
Butirofenona	4.05	4.14
Naftaleno	4.77	4.80
Propilbenceno	5.52	5.41
Heptanofenona	5.82	5.77
Butilbenceno	6.16	6.01
Criseno	6.98	7.11



**Tabla 9.9.** Rectas de transferencia entre cada sistema estudiado y el de referencia (Spherisorb ODS-2 / acetonitrilo).<sup>a</sup>

	Luna C18	Chromolith
Acetonitrilo <sup>a</sup>		
Pendiente ( $b''$ )	0.8680	0.8937
Término independiente ( $a''$ )	0.2223	0.2745
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0.9983	0.9927
Metanol <sup>a</sup>		
Pendiente ( $b$ )	0.9423	0.9082
Término independiente ( $a$ )	0.1988	0.3965
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0.9925	0.9955

<sup>a</sup> De acuerdo a las Ecuaciones (9.15) y (9.16) para acetonitrilo y metanol, respectivamente.

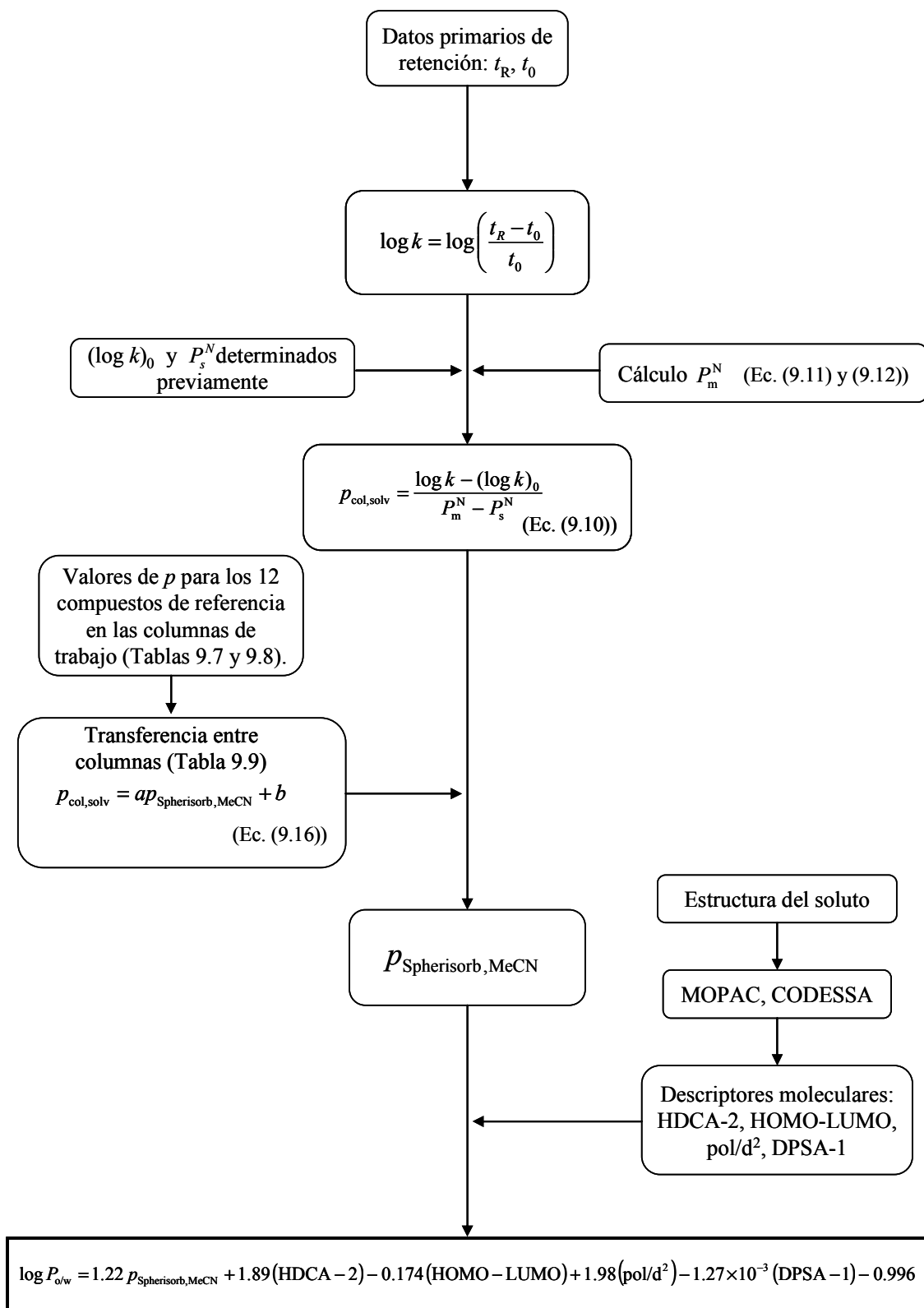
### 9.5.3. Estimación de $\log P_{o/w}$

En la Figura 9.4, se muestra un diagrama de flujo que indica las etapas del método propuesto para estimar  $\log P_{o/w}$  de un compuesto, a partir de los datos primarios de retención obtenidos en un sistema cromatográfico previamente caracterizado (i.e. con valores de  $(\log k)_0$  y  $P_s^N$  conocidos), y de las ecuaciones de transferencia entre el sistema cromatográfico de trabajo y el de referencia.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en la estimación de  $\log P_{o/w}$  para los compuestos orgánicos cuya retención se ha medido en ambas columnas, desglosados en función del modificador orgánico utilizado (acetonitrilo o metanol) y de su composición. Debe considerarse que no todos los compuestos en estudio se inyectaron para cada columna y fase móvil, ya que los compuestos más hidrofóbicos necesitaron un tiempo excesivo para ser eluidos con las fases móviles que contenían una cantidad de modificador orgánico baja. Además, algunos compuestos eluyeron en tiempos razonables con fases móviles de acetonitrilo, pero dieron lugar a tiempos de retención muy elevados con metanol.

Los resultados se muestran gráficamente, representando los valores de  $\log P_{o/w}$  calculados mediante el método propuesto frente a los respectivos valores experimentales de  $\log P_{o/w}$  (incluidos en la Tabla 9.2). Para ambas columnas y modificadores orgánicos, se obtuvieron relaciones lineales de pendiente próxima a la unidad y ordenada en el origen prácticamente nula.

El promedio y la desviación estándar de las diferencias (residuales) entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimado y de referencia (experimental) estuvieron próximos a 0 y 0.3, respectivamente. Se consideraron como valores discrepantes (*outliers*) las diferencias superiores a 0.6 unidades logarítmicas entre el valor estimado y el valor de referencia, que corresponde a dos veces la desviación estándar observada para los residuales ( $2 \times 0.3$ ). Cabe señalar que el método desarrollado es indirecto, y que en el caso del método directo de equilibrado de fases o *shake flash*, la AOAC (*Association of Analytical Communities*) establece como aceptable una diferencia de 0.3 unidades logarítmicas para las determinaciones independientes.



**Figura 9.4.** Esquema del proceso para estimar  $\log P_{o/w}$  a partir de las medidas de retención cromatográficas.

Para cada columna cromatográfica (Luna C18 y Chromolith) se proporcionan dos tablas (una para cada tipo de modificador orgánico), con los resultados obtenidos de las regresiones lineales de valores de  $\log P_{o/w}$  frente a los de referencia: ecuación de la recta, coeficiente de correlación  $R^2$  y desviación estándar. Las regresiones se han realizado, en primer lugar, incluyendo todos los compuestos estudiados, y seguidamente, eliminando aquéllos que ofrecían diferencias superiores a 0.6 unidades logarítmicas respecto del valor de referencia. Los gráficos de las Figuras 9.5 a 9.8 representan las regresiones lineales sin incluir los valores anómalos. Los compuestos anómalos están representados por cuadros blancos (G).

#### **a) Columna Luna C18**

La columna Luna C18 es una columna con cadenas alquílicas C18 enlazadas a un sustrato de base sílice. El diámetro de partícula es de 5  $\mu\text{m}$ , de manera que se puede considerar una columna estándar de uso habitual. Como se puede observar en las Tablas 9.10 y 9.11, esta columna permite la medida cromatográfica de la hidrofobicidad, desde compuestos muy poco hidrofóbicos (i.e. valores de  $\log P_{o/w} < 0$ ), hasta valores de  $\log P_{o/w} = 6$ , de manera que cubre un intervalo de hasta 7 unidades logarítmicas.

Debe mencionarse la dificultad asociada a la medida de la hidrofobicidad de los compuestos más polares (i.e. los menos retenidos), puesto que dependen demasiado críticamente del tiempo muerto del sistema, especialmente en mezclas acetonitrilo-agua. Para los compuestos poco retenidos, pequeñas fluctuaciones en el valor del tiempo muerto pueden afectar al valor de  $\log k$ , y por consiguiente, al  $\log P_{o/w}$  obtenido.

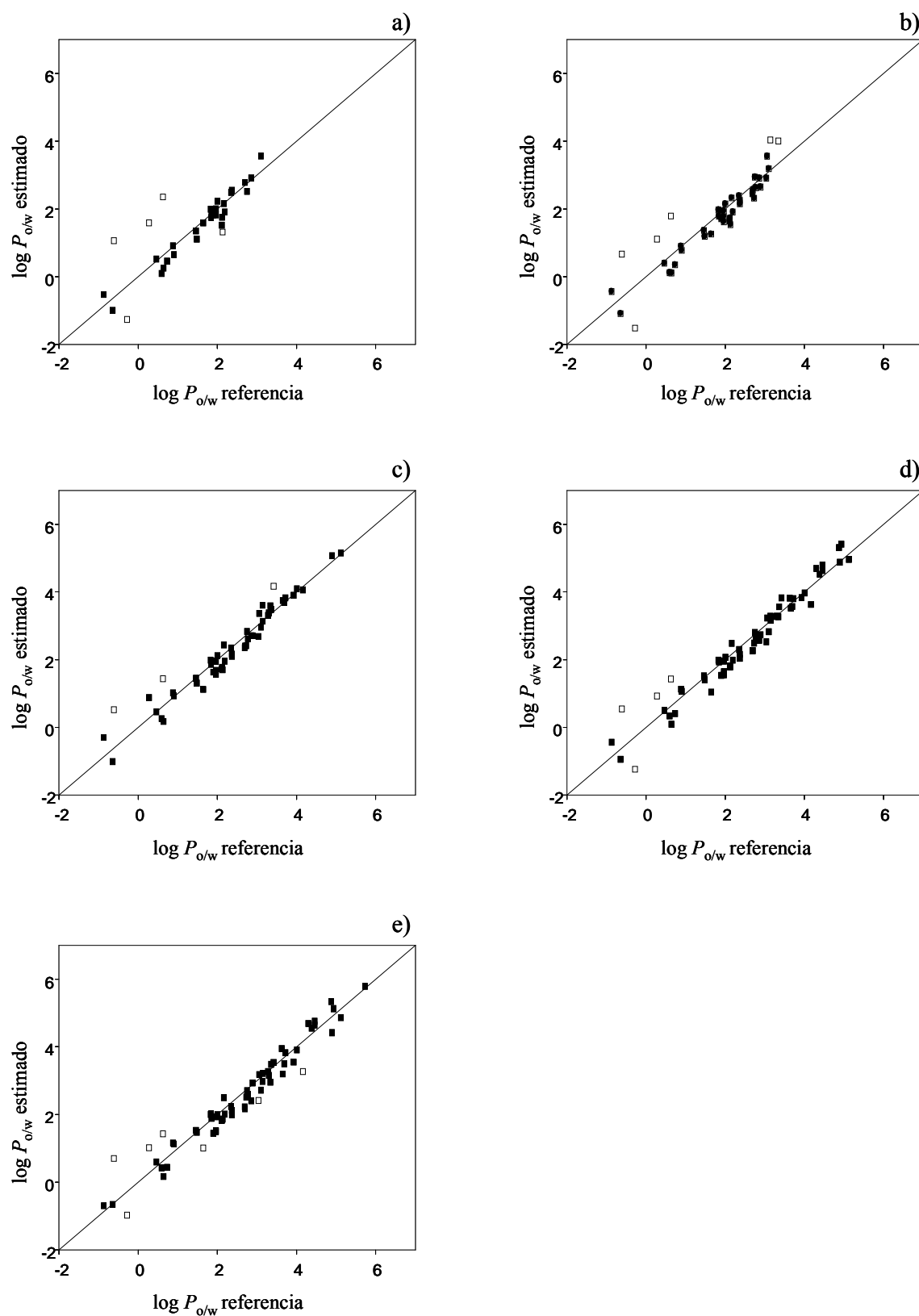
**a1) Fases móviles de acetonitrilo-agua**

Como se observa en la Tabla 9.10 y Figura 9.5, las correlaciones obtenidas entre los valores estimados y los de referencia son muy aceptables para todas las composiciones. Los mejores resultados se obtienen para contenidos de acetonitrilo en el intervalo 40–60%. Debe indicarse que estas fases móviles son las que permitieron la inclusión de un número mayor de compuestos, ya que los tiempos de retención eran más razonables, incluso para los compuestos más hidrofóbicos. Si se trabaja con un contenido de modificador orgánico más bajo (20–30%), se puede mejorar la estimación de los compuestos menos hidrofóbicos, evitando el efecto de la medida del tiempo muerto comentado anteriormente. Sin embargo, la dispersión de los resultados es mayor y no es posible la inclusión de los compuestos más hidrofóbicos, que eluyen a tiempos de retención demasiado elevados.

El número de compuestos con comportamiento anómalo fue mayor a un 60% de acetonitrilo, en muchos casos debido a la existencia de compuestos poco retenidos (e.g. metoxuron y 4-metilciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina), para los que como se ha comentado, su cálculo de  $\log k$  no es suficientemente exacto. Ésta puede ser también la razón de la desviación sistemática que presentan los compuestos más hidrofílicos (e.g. isonicotinamida), para todas las composiciones de fase móvil. Además, algunos compuestos de relativa complejidad estructural a menudo presentan desviaciones.

**Tabla 9.10.** Parámetros de las relaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Luna C18, utilizando acetonitrilo como modificador orgánico.

% MeCN	Regresión incluyendo todos los datos				Regresión sin anómalos						
	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Desviación estándar
20	0.8848	-0.1852	0.7276	33	-1.27 a 3.56	1.0580	-0.1750	0.9448	28	-1.00 a 3.56	0.2490
30	0.9973	-0.0323	0.8444	43	-1.52 a 4.03	1.0348	-0.2051	0.9398	37	-1.10 a 3.55	0.2534
40	0.9674	0.0716	0.9340	54	-1.02 a 5.16	1.0143	-0.0908	0.9594	51	-1.02 a 5.16	0.2593
50	1.0045	-0.0443	0.9439	63	-1.24 a 5.41	1.0495	-0.1946	0.9655	59	-0.95 a 5.41	0.2721
60	0.9605	0.0269	0.9367	64	-0.98 a 5.79	1.0161	-0.1257	0.9664	57	-0.70 a 5.79	0.2700



**Figura 9.5.** Correlaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Luna C18 con acetonitrilo como modificador orgánico. Contenido de acetonitrilo (v/v): (a) 20%, (b) 30%, (c) 40%, (d) 50% y (e) 60%.

## **a2) Fases móviles de metanol-agua**

Al trabajar con metanol como modificador orgánico aparecen algunas diferencias en el comportamiento cromatográfico de los analitos, respecto a su comportamiento en acetonitrilo. Como se puede observar en la Tabla 9.11, existe una mayor dispersión en los resultados, plasmada en los valores de desviación estándar obtenidos para las correlaciones. Al ser un disolvente con menor fuerza eluyente, para obtener retenciones equivalentes a las conseguidas con acetonitrilo es necesario operar a mayores contenidos del disolvente orgánico.

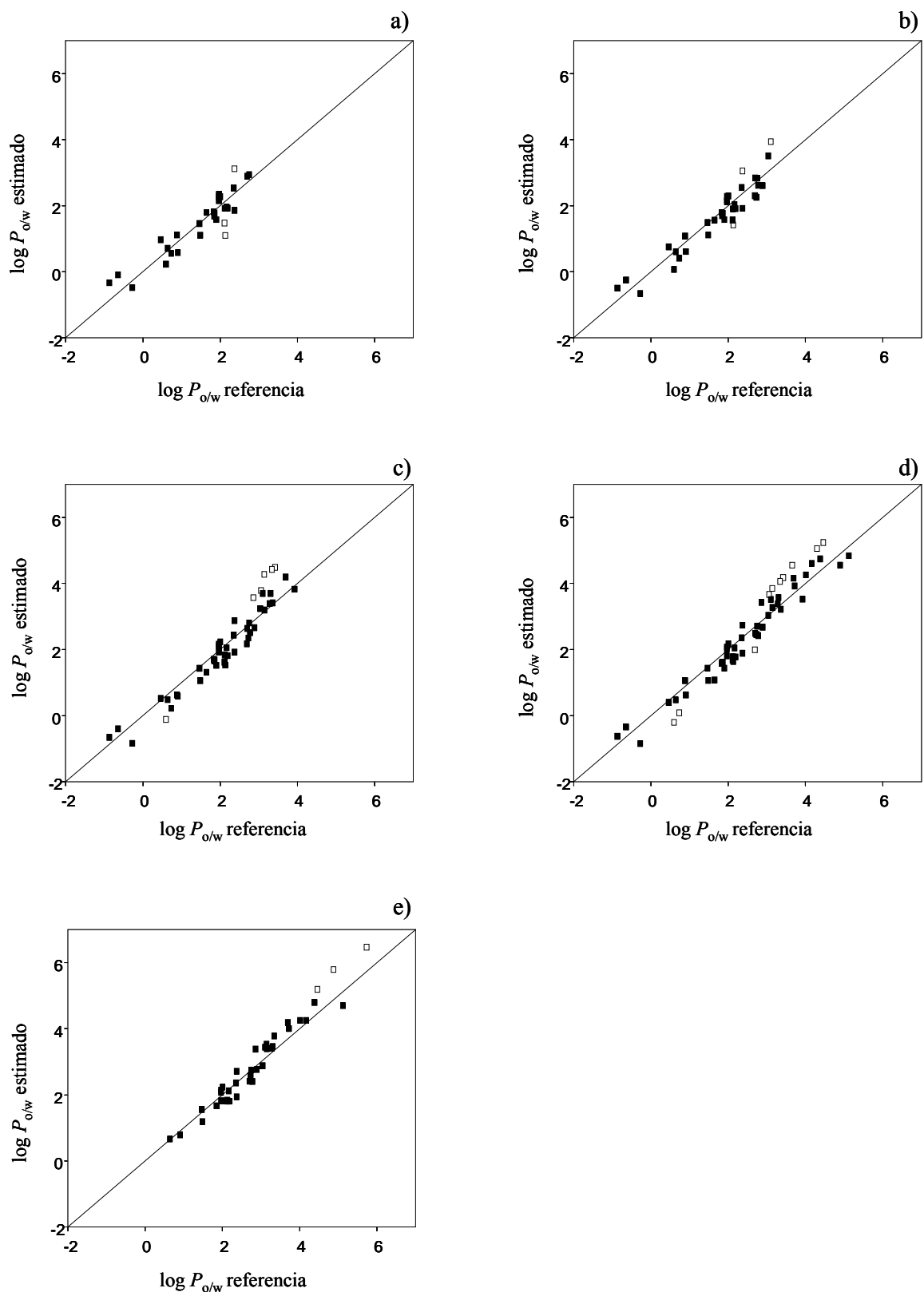
Las mejores correlaciones se obtuvieron cuando se operó con contenidos de metanol en el intervalo 50–60% (Figura 9.6). Los valores estimados de  $\log P_{o/w}$  se corresponden adecuadamente con los de referencia.

Si atendemos ahora a los compuestos anómalos, se observa que algunos de los compuestos más hidrofílicos, con  $\log P_{o/w} < 1$  (e.g. ciclopentanona-isonicotinoil-hidrazina, ciclo-hexanona-isonicotinoil-hidrazina y 4-metilciclohexanona-isonicotinoil-hidrazina) se desvían del comportamiento esperado. Además, aparecen desviaciones en la predicción de  $\log P_{o/w}$  para los compuestos más hidrofóbicos (e.g. antraceno y pireno). Debe notarse que la desviación para estos compuestos es sistemática, y aparece en ambas columnas y composiciones estudiadas. Probablemente se debe a que estos compuestos ya presentan un comportamiento anómalo en la correlación QSPR en la que se basa el método propuesto (Tabla 9.1), que se utilizó para predecir el parámetro  $p$  en un trabajo anterior [36].



**Tabla 9.11.** Parámetros de las relaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Luna C18, utilizando metanol como modificador orgánico.

% MeOH	Regresión incluyendo todos los datos					Regresión sin anómalos					
	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Desviación estándar
30	0.9051	0.1329	0.8364	30	-0.48 a 3.12	0.9158	0.1430	0.9030	27	-0.48 a 2.94	0.2912
40	0.9979	-0.0388	0.8847	36	-0.66 a 3.94	0.9533	0.0072	0.9160	33	-0.66 a 3.51	0.2924
50	1.1670	-0.3465	0.9098	47	-0.84 a 4.49	1.0619	-0.2159	0.9377	41	-0.84 a 4.19	0.3024
60	1.1273	-0.3177	0.9342	56	-0.85 a 5.24	1.0405	-0.1676	0.9519	46	-0.85 a 4.84	0.3057
70	1.1640	-0.3858	0.9527	39	0.67 a 6.47	1.0890	-0.2155	0.9359	36	0.67 a 4.79	0.2710



**Figura 9.6.** Correlaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Luna C18 con metanol como modificador orgánico. Contenido de acetonitrilo (v/v): (a) 30%, (b) 40%, (c) 50%, (d) 60% y (e) 70%.

### **b) Columna Chromolith**

La columna Chromolith es distinta de las columnas convencionales, ya que permite trabajar a flujos mayores, dando lugar a tiempos de retención más bajos. Está formada por un monolito de sílice uniforme y altamente poroso, con una estructura bimodal de macroporos y mesoporos con un diámetro aproximado de 2.2  $\mu\text{m}$  y 13 nm, respectivamente [44]. Los macroporos se hallan interconectados a través de canales por los que fluye la fase móvil. Los mesoporos se encuentran en el sólido poroso. Los macroporos confieren a la columna una elevada permeabilidad (i.e. baja resistencia hidráulica). De ahí que se pueda operar a presiones más reducidas para mantener el flujo deseado respecto de los valores equivalentes en columnas convencionales. La especial estructura y comportamiento de las columnas monolíticas las hace particularmente adecuadas para conseguir separaciones rápidas, o para el análisis de muestras altamente viscosas. Además, los mesoporos las dotan de una gran área superficial recubierta con fase estacionaria.

La posibilidad de realizar la separación a flujos más elevados (en nuestro trabajo, a 2 ml min<sup>-1</sup>) permitió la determinación de log  $P_{o/w}$  para compuestos altamente hidrofóbicos (log  $P_{o/w}$  = 7), permitiendo el estudio de compuestos en un intervalo de log  $P_{o/w}$  de 6 unidades logarítmicas.

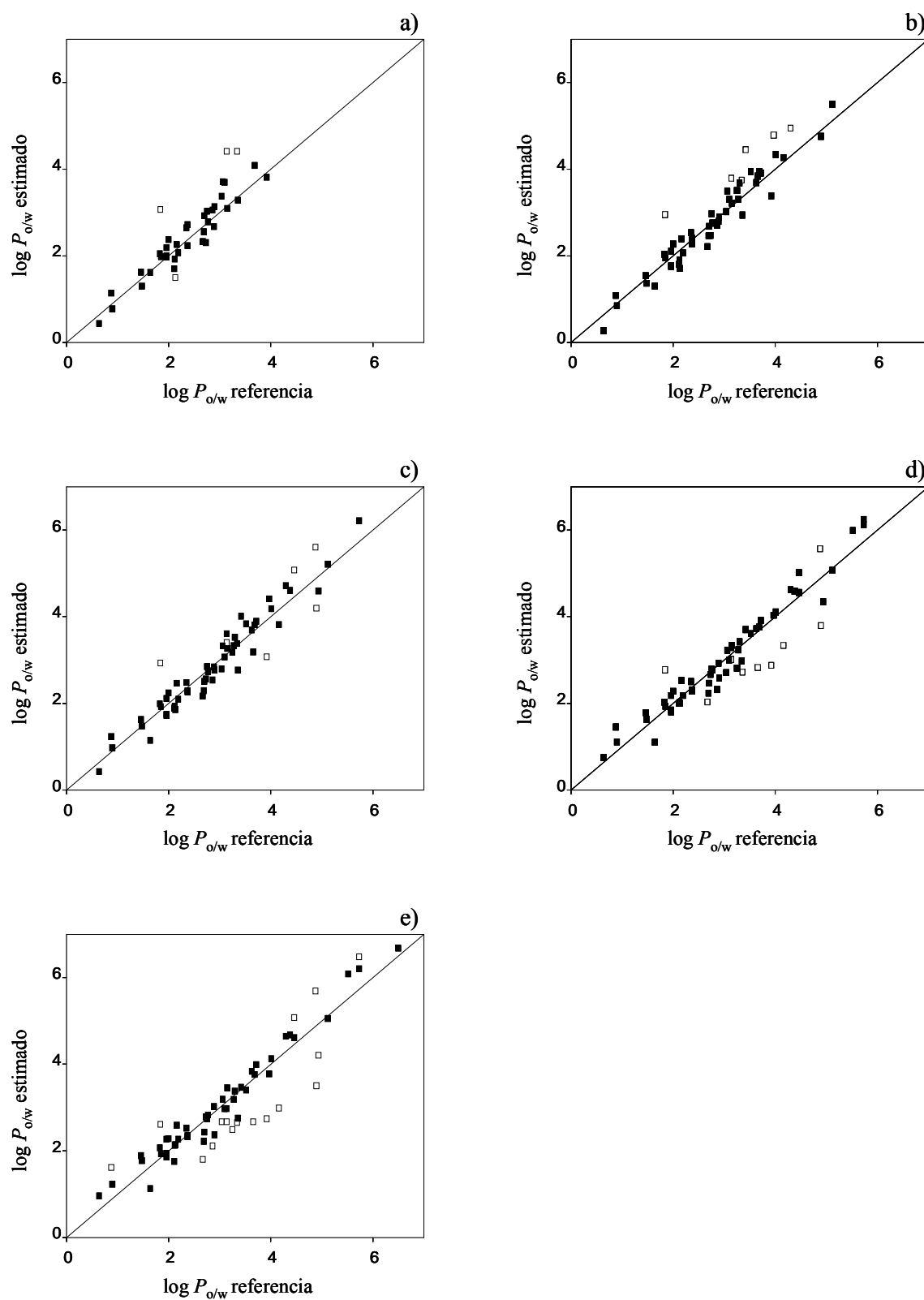
#### **b1) Fases móviles de acetonitrilo-agua**

La Tabla 9.12 y la Figura 9.7 muestran la bondad de las correlaciones entre los valores estimados de log  $P_{o/w}$  y los de referencia. Las mejores correlaciones correspondieron a fases móviles con un contenido de acetonitrilo en el intervalo 50–60%. Sin embargo, en este intervalo aparece un mayor número de compuestos con comportamiento anómalo (especialmente al 60% de acetonitrilo). La dispersión de los resultados, una vez eliminados los valores anómalos, fue pequeña y del mismo orden que la obtenida para la columna Luna C18.

A diferencia de la Luna C18, la columna Chromolith puede utilizarse para el estudio de compuestos muy hidrofóbicos con buenos resultados. Sin embargo, no es adecuada para los compuestos más hidrofílicos.

**Tabla 9.12.** Parámetros de las relaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Chromolith, utilizando acetónitrilo como modificador orgánico.

% MeCN	Regresión incluyendo todos los datos				Regresión sin anómalos						
	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Desviación estándar
20	1.1256	-0.1638	0.8147	39	0.44 a 4.42	1.0651	-0.0868	0.9056	35	0.44 a 4.09	0.2615
30	1.1035	-0.1961	0.9098	53	0.27 a 5.50	1.0701	-0.1861	0.9485	47	0.27 a 5.50	0.2414
40	1.0272	-0.0684	0.9128	58	0.42 a 6.22	1.0519	-0.1482	0.9435	53	0.42 a 6.22	0.2712
50	0.9781	0.0380	0.8935	61	0.74 a 6.25	1.0326	-0.0603	0.9534	53	0.74 a 6.25	0.2739
60	0.9674	0.0592	0.8595	62	0.96 a 6.68	1.0261	-0.0168	0.9571	47	0.96 a 6.68	0.2662



**Figura 9.7.** Correlaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Chromolith con acetonitrilo como modificador orgánico. Contenido de acetonitrilo (v/v): (a) 20%, (b) 30%, (c) 40%, (d) 50% y (e) 60%.

Si se analizan los compuestos con comportamiento anómalo de la Fig. 9.8, se observa un aumento de dispersión al incrementarse el contenido de acetonitrilo en la fase móvil. Además, se pueden agrupar los compuestos anómalos según su comportamiento, en dos categorías:

- (i) El primer grupo de compuestos presenta una desviación sistemática en el valor de  $\log P_{o/w}$  estimado para todas las composiciones de fase móvil, siendo el sesgo positivo (e.g. 3,5-diclorofenol, antraceno y pireno) o negativo (e.g. 1-decanoil-2-isonico-tinoil-hidrazina).
- (ii) Para el segundo grupo de compuestos, el valor de  $\log P_{o/w}$  aumenta o disminuye al incrementarse el contenido de acetonitrilo (e.g. flurbiprofen y 2-benziltio-1H-benzo[d]imi-dazol). Así, para algunas composiciones de la fase móvil, el valor estimado se correlaciona aceptablemente con el valor de referencia, mientras que para otras, la desviación es muy significativa. La desviación crece especialmente al incrementarse el contenido de acetonitrilo (i.e. se observan más anómalos al trabajar al 60% de acetonitrilo que al 40%). A esta categoría pertenecen la mayoría de los compuestos anómalos observados.

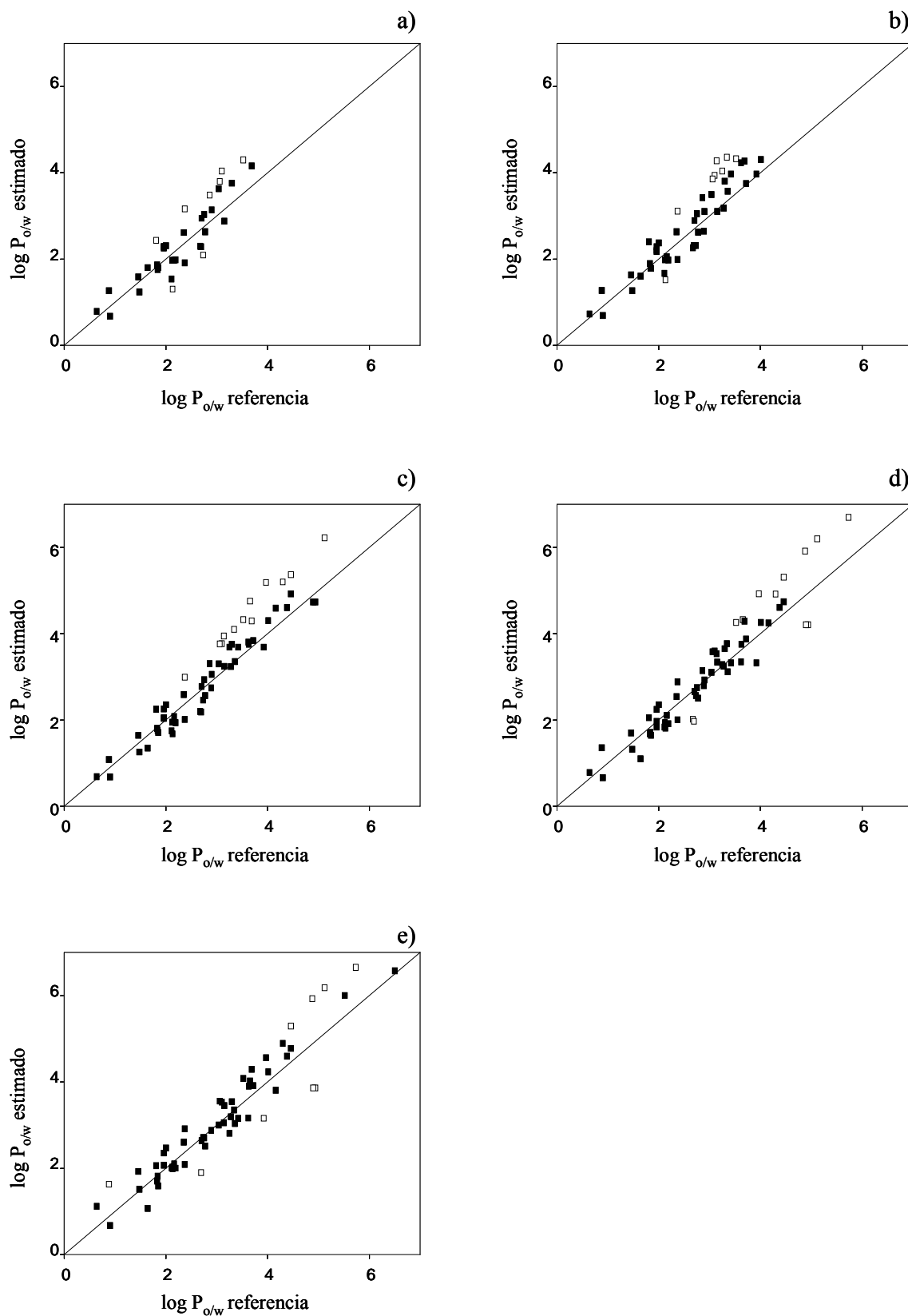
## ***b2) Fases móviles de metanol-agua***

Utilizando metanol como modificador orgánico, se observa que el comportamiento lineal entre el valor de  $\log P_{o/w}$  estimado y el de referencia proporciona también correlaciones aceptables (Tabla 9.13 y Figura 9.8). Para todos los contenidos de metanol estudiados, se obtuvo una pendiente con un valor cercano a la unidad y un término independiente próximo a cero. La dispersión es mayor que la obtenida para acetonitrilo, aunque continúa siendo aceptable y no se incrementa con el contenido de modificador orgánico.

Sin embargo, los valores estimados de  $\log P_{o/w}$  para algunos compuestos muy hidrofóbicos ( $\log P_{o/w} > 5$ ) son superiores a los esperados (e.g. antraceno, criseno, hexaclorobenceno, pentaclorofenol y pireno). Además, al igual que con acetonitrilo, algunos compuestos de estructura compleja (e.g. ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, y 2-benzil-tio-1H-benzo[d]imidazol) dan lugar a valores discrepantes para contenidos de metanol extremos, aunque aceptables a composiciones intermedias.

**Tabla 9.13.** Parámetros de las relaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Chromolith, utilizando metanol como modificador orgánico.

% MeOH	Regresión incluyendo todos los datos					Regresión sin anómalos					
	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Pendiente	Término independiente	$R^2$	$n$	Intervalo $\log P_{o/w}$	Desviación estándar
30	1.1554	-0.2393	0.7956	36	0.68 a 4.30	1.0536	-0.0722	0.8583	29	0.68 a 4.16	0.3110
40	1.1837	-0.2769	0.8581	47	0.69 a 4.36	1.0823	-0.1099	0.8995	39	0.69 a 4.31	0.2952
50	1.1788	-0.3221	0.9121	58	0.68 a 6.23	1.0561	-0.1234	0.9420	46	0.68 a 4.93	0.2616
60	1.1365	-0.3016	0.9036	60	0.66 a 6.70	1.0571	-0.1066	0.9208	48	0.66 a 4.74	0.2842
70	1.0782	-0.1343	0.8931	59	0.67 a 7.08	1.0567	-0.0771	0.9348	49	0.67 a 6.58	0.3121



**Figura 9.8.** Correlaciones lineales entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados y de referencia para la columna Chromolith con metanol como modificador orgánico. Contenido de metanol (v/v): (a) 30%, (b) 40%, (c) 50%, (d) 60% y (e) 70%.



## 9.6. Conclusiones

Las correlaciones entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados con el método propuesto y los valores de referencia son, por lo general, aceptables para las dos columnas ensayadas y para los dos modificadores a diversas composiciones de la fase móvil.

La columna Luna C18 proporcionó correlaciones muy satisfactorias, especialmente cuando se utilizó acetonitrilo como modificador orgánico, destacando las correlaciones obtenidas a contenidos de acetonitrilo en el intervalo 40–60%. Para las fases móviles preparadas con metanol se obtuvieron correlaciones con una dispersión ligeramente mayor y términos independientes no tan próximos a cero como en el caso del acetonitrilo. Debe señalarse que el uso de la columna Luna C18 da acceso a un amplio intervalo de valores de  $\log P_{o/w}$  cuando el disolvente es acetonitrilo (desde  $-1$  hasta  $+6$ , unas 7 unidades logarítmicas), de modo que permite el estudio de compuestos altamente hidrofílicos, además de compuestos de hidrofobicidad media y alta. Los resultados son también satisfactorios cuando se utiliza metanol como modificador orgánico, en particular para compuestos con valores de  $\log P_{o/w}$  en el intervalo  $+1$  a  $+6$ . En este caso, es conveniente utilizar fases móviles con un alto contenido en metanol (e.g. 50–60%).

La columna Chromolith proporciona valores de  $\log P_{o/w}$  estimados que correlacionan correctamente con los respectivos valores de referencia: la pendiente de la correlación es muy cercana a la unidad y el término independiente es prácticamente nulo, especialmente a contenidos de acetonitrilo del 50% y 60%. La dispersión es del mismo orden que la observada para la columna Luna C18, pero aumenta ligeramente al incrementarse el contenido de acetonitrilo en la fase móvil. Si consideramos los resultados obtenidos al utilizar metanol como modificador orgánico, la dispersión es muy similar a la observada para acetonitrilo. Las mejores correlaciones se obtuvieron para contenidos de metanol en el intervalo 50–70%, aunque el término independiente fue ligeramente inferior a cero, dando lugar a una pequeña desviación en la predicción de los valores de  $\log P_{o/w}$ . Sin embargo, esta columna es apropiada para la estimación de  $\log P_{o/w}$  de compuestos muy hidrofóbicos, con valores de  $\log P_{o/w}$  próximos a  $+7$ .

Respecto a los compuestos con comportamiento anómalo, se debe señalar que el método se basa en la caracterización de la polaridad del soluto mediante un único parámetro,  $p$ , que presenta una ligera dependencia del sistema separador utilizado para su determinación [32–34]. El modelo de separación de contribuciones polares en que se basa

$p$  es adecuado para la mayoría de compuestos de estructura relativamente sencilla, que dan lugar a un valor de  $p$  constante a cualquier composición de la fase móvil con un determinado modificador orgánico, si bien a veces existe una pequeña dispersión a bajas concentraciones de modificador. Sin embargo, existen algunos compuestos de estructura más compleja, para los que se obtienen valores de  $p$  que aumentan o disminuyen significativamente al variar la composición de la fase móvil y precisan de un segundo parámetro caracterizador que contemple otras interacciones también presentes en la columna (e.g. enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y otras interacciones intramoleculares), con el fin de mejorar la predicción de la retención. Éste es el motivo por el que estos compuestos proporcionan valores de  $\log P_{o/w}$  anómalos en fases móviles cuyo contenido en modificador orgánico es extremo, mientras que a contenidos intermedios dan lugar a buenos resultados.

El modelo de polaridad se basa en la hipótesis de que el mecanismo de reparto del soluto entre la fase móvil y la estacionaria es el único responsable de la retención. En consecuencia, si existiera alguna otra interacción que afectara a la retención cromatográfica, el modelo ya no sería adecuado y proporcionaría resultados erróneos. Aún así, el modelo de polaridad de un solo parámetro presenta la ventaja de su simplicidad experimental: por un lado, su ajuste (una vez caracterizado el sistema) sólo requiere de un único cromatograma, y por otro, proporciona estimaciones adecuadas de la hidrofobicidad de los compuestos orgánicos para un intervalo muy amplio de valores de  $\log P_{o/w}$ .

Con todo, es preferible utilizar contenidos de modificador orgánico intermedios (i.e. evitando concentraciones extremas), a fin de evitar el efecto de las variaciones lineales, ascendentes o descendentes, del parámetro de polaridad del soluto  $p$  que se producen en algunos compuestos de estructura compleja. En el caso de compuestos muy hidrofílicos, es posible operar a contenidos bajos de modificador para evitar valores de  $\log k$  demasiado pequeños (i.e. con tiempos de retención cercanos al tiempo muerto), cuyo error asociado es mayor. En el caso de los compuestos más hidrofóbicos, se puede operar a mayores contenidos de modificador, con el fin de que el compuesto eluya en un tiempo razonable. Así, es necesario realizar una evaluación previa del valor de  $\log P_{o/w}$  del compuesto considerado (a partir de su estructura), para establecer qué columna y modificador orgánico será el más adecuado.

Se estudiaron los resultados proporcionados por los dos disolventes orgánicos más comunes en cromatografía líquida: acetonitrilo y metanol. El primero proporcionó mejores resultados tanto en cuanto a la dispersión de los resultados como a la bondad de las rectas obtenidas. Esta observación coincide con las conclusiones publicadas por Valkó *et al.* [45], que correlacionaron el parámetro de hidrofobicidad CHI con  $\log P_{o/w}$  y encontraron los mejores resultados en fases móviles de acetonitrilo-agua. También en cierto modo concuerdan con un trabajo anterior, donde se obtuvieron los parámetros de polaridad para dos columnas, una de ellas la Chromolith. En aquel trabajo, las predicciones de  $\log k$  mediante el modelo de polaridad utilizando el parámetro  $p$  del soluto, obtenido mediante la recta de calibrado con los 12 compuestos seleccionados, fueron más exactas cuando se utilizó acetonitrilo [34].

El método propuesto no hace uso directo de la retención cromatográfica para estimar  $\log P_{o/w}$ , sino que atiende también a propiedades del compuesto relacionadas directamente con su estructura química. Se trata de un método experimental que puede ser utilizado para compuestos de nueva síntesis, para los que no existen congéneres homólogos de hidrofobicidad conocida, y es válido en sistemas cromatográficos diversos.

## 9.7. Referencias

1. S.K. Poole, C.F. Poole, J. Chromatogr. B 797 (2003) 3.
2. T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 5175.
3. Z. Shi, J. He, T. Yao, W. Chang, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 27 (2005) 465.
4. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1995 (Test No. 107).
5. A. Finizio, M. Vighi, D. Sandroni, Chemosphere 34 (1997) 131.
6. L. Hitzel, A.P. Watt, K.L. Locker, Pharm. Research 17 (2000) 1389.
7. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2000 (Test No. 122).
8. G. Bouchard, P.A. Carrupt, B. Testa, V. Gobry, H.H. Girault, Chem. Eur. J. 8 (2002) 3478.
9. C. Helweg, T. Nielsen, P.E. Hansen, Chemosphere 34 (1997) 1673.
10. A. Paschke, M. Manz, G. Schüürmann, Chemosphere 45 (2001) 721.

11. V. Makovskaya, J.R. Dean, W.R. Tomlinson, S.M. Hitchen, M. Comber, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 183.
12. V. Makovskaya, J.R. Dean, W.R. Tomlinson, M. Comber, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 193.
13. J.W. Zou, W.N. Zhao, Z.C. Shang, M.L. Huang, G. Ming, Q.S. Yu, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 11550.
14. X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 51.
15. C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 79.
16. C. Giaginis, S. Teocharis, A. Tsantili-Kakoulidou, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 116.
17. K. Valkó, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 299.
18. F. Lombardo, M.Y. Shalaeva, K.A. Tupper, G. Feng, M.H. Abraham, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2922.
19. P.A. Tate, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 37.
20. P. Vallat, W. Fan, N. El Tayar, P.A. Carrupt, B. Testa, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992), 2133.
21. S. Griffin, S. Grant Wyllie, J. Markham, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 221.
22. A. Berthod, S. Carda Broch, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 3.
23. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2004 (Test No. 117).
24. M.H. Abraham, H.S. Chadha, A.J. Leo, *J. Chromatogr. A* 685 (1994) 203.
25. E. Lázaro, C. Ràfols, M.H. Abraham, M. Rosés, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4861.
26. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, A.M. Zissimos, M.H. Abraham, *Anal. Chim. Acta* 515 (2004) 209.
27. M.J. Medina Hernández, S. Sagrado, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 273.
28. M.J. Ruíz Ángel, S. Carda Broch, M.C. García Álvarez-Coque, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 279.
29. S. Carda Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 55.
30. S. Carda Broch, A. Berthod, *Chromatographia* 59 (2004) 79.
31. M. Kah, C. D. Brown, *Chemosphere* 72 (2008) 1401.
32. E. Bosch, P. Bou, M. Rosés, *Anal. Chim. Acta* 299 (1994) 219.

33. J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 955 (2002) 19.
34. P. Izquierdo, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 1107 (2006) 96.
35. E. Lázaro, C. Ràfols, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1081 (2005) 163.
36. R. Bosque, J. Sales, E. Bosch, M. Rosés, M.C. García Álvarez-Coque, J.R. Torres Lapasió, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 43 (2003) 1240.
37. A.R. Katritzky, V.S. Lohanov, M. Karelson, CODESSA 2.13, Semichem and the University of Florida, 1997.
38. X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, Sep. Purif. Rev. 36 (2007) 231.
39. M. Rosés, F. Rived, E. Bosch, J. Chromatogr. A 867 (2000) 45.
40. F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 439 (2001) 315.
41. S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 964 (2002) 55.
42. J.P.P. Stewart, MOPAC 6.0, Quantum Chemistry Program Exchange, QCPE, No. 455, Indiana University, Bloomington, IN. 1989.
43. A. Leo, D. Hoekman, C. Hansch. Exploring QSAR, Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC American Chemical Society (1995). ISBN 978-0841230606.
44. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J. High. Resol. Chromatogr. 23 (2000) 93.
45. K. Valkó, C. My Du, C. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, Current Med. Chem. 8 (2001) 1137.
46. J. Sangster, "Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry", Series in Solution Chemistry (Vol. 2), Wiley, Chichester (1997), 178 págs.



## Conclusiones

### ***C.1. Estimación del tiempo muerto***

#### ***C.1.1. Marcadores de tiempo muerto y el método de la serie homóloga***

- El principal problema de los métodos directos utilizados para estimar el tiempo muerto es la ausencia de marcadores ideales. Los marcadores más comunes se retienen ligeramente o se hallan parcialmente excluidos de la fase estacionaria. Además, los tiempos de retención dependen de las condiciones de separación: un compuesto que se considera un buen marcador en unas condiciones experimentales, puede encontrarse más o menos retenido en otras.
- Un compuesto no retenido ideal debería ser suficientemente pequeño como para acceder a todo el volumen disponible de los poros de la fase estacionaria, y suficientemente hidrofílico como para no interactuar con la fase enlazada. No deberían producirse tampoco procesos de intercambio iónico. No es fácil encontrar compuestos que cumplan estas condiciones: se ha comprobado que distintas moléculas neutras pequeñas muestran tiempos de retención que disminuyen al incrementarse la hidrofobicidad de la fase móvil.
- La medida de la retención de 12 marcadores de uso común en el intervalo de acetonitrilo 10–90% indicó que la variación del tiempo de retención con la composición de la fase móvil es importante para tres de ellos (ácidos 2-nitrobenzoico, benzoico y pícrico). Además, la retención varió ligeramente para otros tres (dimetilformamida, acetona y floroglucinol). Únicamente KBr, KI, tartracina, tiourea, uracilo y urea se comportaron como compuestos verdaderamente no retenidos, aunque mostraron pequeñas diferencias en el valor del tiempo muerto, que deberían atribuirse a su distinta accesibilidad a los poros del empacado de la columna cromatográfica, y a la existencia de interacciones residuales.

- Por su parte, los distintos resultados obtenidos con diferentes series homólogas se deben mayoritariamente al propio método matemático y a la calidad de los datos procesados, ya que el tiempo muerto se obtiene por extrapolación. El problema proviene del gran peso en el ajuste de los datos de los compuestos más retenidos, que actúan como puntos niveladores.
- Se comprobó que la eliminación secuencial de los homólogos de mayor retención convergía hacia una estimación consistente del tiempo muerto, cuando el tiempo de retención máximo se hallaba próximo o por debajo de 5–6 min. Se adoptó el criterio arbitrario de promediar las estimaciones para  $t_{R,max} \sim 2 t_0$  (el tiempo muerto estimado). La serie homóloga debería contener al menos cuatro compuestos con retención baja. De lo contrario, se producirían sobreestimaciones del tiempo muerto.
- El ajuste directo de la Ecuación (2.8) (Capítulo 2) (obtenida a partir del ajuste lineal de  $\log k$  frente al contenido de disolvente orgánico), llevado a cabo individualmente para cada nitrosamina, dio lugar a estimaciones del tiempo muerto que dependían fuertemente del compuesto. Este comportamiento debería interpretarse, al menos parcialmente, como debido a los diversos intervalos de tiempo de retención para cada soluto y a la insuficiente exactitud en la medida de los tiempos de retención (y del contenido de disolvente orgánico).
- Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento simultáneo de toda la información disponible (los datos de varios compuestos y varias composiciones de fase móvil) debería ser beneficioso para la estimación del tiempo muerto.



### ***C.1.2. Método de regresión iterativo alternante a partir de datos obtenidos de diseños experimentales***

- Se encontró que los valores de tiempo muerto estimados a partir de la Ecuación (3.7) (Capítulo 3), aplicada individualmente a cada soluto, eran demasiado variables para ser útiles en la práctica. Por un lado, los resultados se vieron seriamente afectados por la magnitud de los tiempos de retención procesados, y por otro, eran demasiado sensibles a desviaciones menores. Cada soluto convergió a un valor de  $t_0$  distinto, que se correlacionó positivamente con su hidrofobicidad. Estos resultados ilustran por qué este método no ha sido recomendado para la estimación del tiempo muerto.
- El método de regresión iterativo alternante propuesto se basa en una relación subyacente entre el factor de retención de los compuestos retenidos y la composición de la fase móvil. El algoritmo trata de encontrar un valor común de  $t_0$  capaz de predecir, con la máxima exactitud, los tiempos de retención de los compuestos para cada condición experimental. El método permite el uso simultáneo de la información proporcionada por varios compuestos, a diversas composiciones de fase móvil, compensando la falta de exactitud o insuficiencia de algunos datos, lo que aumenta la fiabilidad en la estimación del tiempo muerto.
- La inclusión de solutos lentos (i.e. con tiempos de retención alejados de  $t_0$ ) dio lugar, generalmente, a sobreestimaciones del valor de tiempo muerto. La razón es que el método está basado en extrapolaciones, y las inexactitudes en los datos alejados del origen, que actúan como puntos niveladores, afectan fuertemente al ajuste y sesgan los resultados. Es el mismo problema que aparece en el método de la serie homóloga.
- Los resultados ganaron coherencia al eliminar de forma secuencial los tiempos de retención más elevados. A lo largo de los ciclos de eliminación, el valor estimado de  $t_0$  normalmente (pero no siempre) disminuyó, y finalmente se estabilizó. Este proceso de eliminación puede aplicarse siempre que permanezca un número de datos suficiente para realizar las regresiones: los tiempos de retención para al menos tres fases móviles para cada compuesto. Puesto que la información se empobrece gradualmente, debido a la pérdida de datos producida por la eliminación, se observa una fuerte disminución final en el valor de  $t_0$  estimado.

Esta pauta indica que no deben eliminarse más datos, y que los resultados previos inseguros deberían descartarse antes de realizar el promedio. Si, inicialmente, la matriz de tiempos de retención incluyera valores inapropiados, la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados garantizará la convergencia a resultados consistentes.

- El valor final de tiempo muerto se obtuvo promediando aquellas estimaciones que cumplían la condición  $t_{R,max} \leq 2t_0$ , pero cuando  $t_{R,max}$  en la última iteración era  $> 2t_0$ , se promediaron los resultados de las cinco últimas iteraciones. Estas decisiones se tomaron arbitrariamente después de examinar los comportamientos de convergencia para un gran número de casos.
- El método propuesto asume de manera implícita que el volumen muerto estimado es el espacio accesible a los solutos durante su elución cromatográfica, que la accesibilidad de cada soluto a los poros de la fase estacionaria es similar, y que el volumen muerto no se ve afectado significativamente por los cambios en la composición de la fase móvil.
- Idealmente, el método opera de manera óptima en intervalos de concentración de disolvente orgánico relativamente estrechos, en los que la aproximación lineal (Ecuación (3.4) en el Capítulo 3) es válida. Ello también garantiza que las posibles variaciones de  $t_0$  con la composición de la fase móvil sean mínimas. Además, la eliminación secuencial de los tiempos de retención más elevados también contribuye a la disminución del impacto de los cambios eventuales en la capa de solvatación con la composición de la fase móvil, y favorece el cumplimiento de las condiciones descritas anteriormente.
- El método permite la estimación del tiempo muerto utilizando los tiempos de retención de compuestos en un estudio que implique el desarrollo de un diseño experimental, para realizar una optimización o con otros propósitos, sin la necesidad de utilizar compuestos externos. El único requisito necesario es que los compuestos no se retengan excesivamente en las condiciones de trabajo. De hecho, el método hace uso únicamente de los datos de retención de dos o más compuestos (no excesivamente retenidos) para tres o cuatro composiciones de fase móvil.

- Se llevó a cabo una validación exhaustiva por comparación de los resultados con los proporcionados por la inyección de marcadores no retenidos, el método de la primera perturbación, y el método de la serie homóloga. Se encontró, además, que diferentes grupos de compuestos proporcionaron el mismo valor de  $t_0$  para la misma columna, lo que se verificó para distintas ventanas de composición de disolvente orgánico.

## C.2. Estimación de la capacidad de pico en elución isocrática

- La capacidad de pico es un concepto útil para describir el comportamiento de una columna cromatográfica, pero sólo es accesible a través de cálculo, ya que se basa en una situación poco usual en la práctica: un cromatograma con picos bien distribuidos y resueltos, sin espacio entre ellos. Con el propósito de estimar la capacidad de pico, se decidió adoptar una distancia entre picos consecutivos con  $R_s = 1.5$  (i.e.  $w = 6\sigma$ ), debido al decrecimiento pseudo-exponencial próximo a la línea base que incrementa la probabilidad de solapamiento entre picos cromatográficos adyacentes no gaussianos.
- El llamado “método intuitivo” estima la capacidad de pico como el tamaño de la ventana cromatográfica medido en unidades de anchura de pico, asumiendo que todos los picos poseen la misma anchura. La medida de las anchuras de un grupo numeroso de picos de un cromatograma puede requerir un tiempo considerable, de ahí que muy a menudo la capacidad de pico se estime promediando tan sólo la anchura de un número reducido de picos.
- La suposición para el método intuitivo de que todos los picos en un cromatograma poseen la misma anchura contrasta con los métodos propuestos por Giddings y Grushka, en los que la anchura depende del tiempo de retención, aunque la eficacia ( $N$ ) se considera invariable. Sin embargo,  $N$  a menudo tiende a aumentar con la retención, por lo que la suposición de que solutos que eluyen a diferentes tiempos de retención tienen asociada una misma  $N$  podría originar una estimación errónea de la capacidad de pico. De hecho, se han publicado varias modificaciones para el método de Grushka que consideran los cambios en la eficacia con la retención.

- Se proponen aquí tres métodos basados en descripciones realistas del perfil de pico. El primero se basa en el método de Grushka y considera las contribuciones columnares y extra-columnares a las varianzas de pico. El segundo método se basa en el método de Giddings y supone picos asimétricos. El tercer método, basado en el método intuitivo, utiliza una anchura de pico promedio obtenida por integración, en lugar de utilizar el valor promedio obtenido a partir de varios picos representativos.
- En la modificación del método de Giddings propuesta aquí, se supone que las semianchuras frontal ( $A$ ) y de cola ( $B$ ) (medidas al 10% de la altura del pico para considerar su deformación) dependen linealmente del tiempo de retención (lo que es correcto en los intervalos de contenido de disolvente orgánico considerados generalmente en un procedimiento cromatográfico).
- En RPLC con fases móviles hidro-orgánicas, las pendientes de las dependencias entre  $A$  y  $B$  y el tiempo de retención pueden considerarse características de un sistema columna/disolvente a temperatura fija (la suma de las pendientes está relacionada con la eficacia de la columna, mientras que su relación es una medida global de la asimetría del pico), siempre que se utilice el mismo conjunto de solutos con aproximadamente la misma eficacia y asimetría intrínsecas para todos los compuestos. Por su parte, las ordenadas en el origen de estas dependencias ( $A_0$  y  $B_0$ ) están asociadas mayoritariamente a las contribuciones extra-columnares y son progresivamente más significativas para los picos más estrechos que aparecen a tiempos de retención menores.
- El disolvente orgánico se adsorbe sobre la fase estacionaria, afectando al equilibrio de reparto del soluto. De ahí que se observen algunos cambios en los parámetros de perfil de pico ( $A$  y  $B$ ) con la composición de la fase móvil. Esto sugiere que su medida debería realizarse preferiblemente con un conjunto de compuestos eluidos con una única fase móvil. Esto es incluso más importante con fases móviles que contienen un tensioactivo y un disolvente orgánico, debido a que se modifica el grosor de la capa de tensioactivo sobre la fase estacionaria, lo que altera la eficacia.

- Los resultados de los tres nuevos métodos se compararon con los proporcionados por el método clásico de Giddings para picos ideales, y con una modificación del método de Grushka que considera cambios en la anchura de pico medida a mitad de su altura. El número correcto de picos se obtuvo a partir de cromatogramas sintéticos, contruidos mediante la adición de picos reales de nuestra base de datos.
- El método de Giddings modificado (Ecuación (4.48)) ofreció errores de predicción en los intervalos de  $-3.0$  a  $+4.4\%$  y de  $-1.1$  a  $+0.8\%$  para los modos hidro-orgánico y micelar, respectivamente, mientras que el método clásico (Ecuación (4.39)), adaptado en este trabajo para  $R_s = 1.5$ , proporcionó por lo general sobreestimaciones del número de picos, con errores de predicción situados en los intervalos  $18.3$ – $33.8\%$  y  $6.7$ – $21.4\%$  para los modos hidro-orgánico y micelar, respectivamente.
- El método de Grushka modificado desarrollado en este trabajo, basado en la Ecuación (4.31) combinada con las Ecuaciones (4.33) o (4.34)), dio lugar a errores de predicción en los intervalos de  $0$  a  $+1.0\%$ , y de  $-0.4$  a  $-3.6\%$ , respectivamente, para el modo hidro-orgánico, y de  $-2.0$  a  $+2.3\%$ , y de  $+0.5$  a  $+3.3\%$ , respectivamente, para el modo micelar.
- El método intuitivo modificado basado en el promedio de las anchuras de los picos (Ecuación (4.56)) subestimó el número de picos como consecuencia del gran peso de los picos más anchos en la obtención del promedio.
- Los resultados mostraron que la anchura de pico (y no su deformación) es el factor relevante en la estimación de la capacidad de pico, al menos en los ejemplos estudiados. Sin embargo, en otras situaciones, la asimetría podría ser un factor relevante (e.g. picos electroforéticos altamente deformados).

### C.3. Comportamiento cromatográfico de compuestos ionizables

#### ***C.3.1.Efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura***

- Tradicionalmente, el contenido de disolvente orgánico y el pH de la fase móvil se han utilizado preferentemente como factores para controlar las separaciones en RPLC, debido a sus fuertes efectos sobre la retención y la selectividad. La temperatura no suele considerarse como un factor a optimizar. Sin embargo, incluso en los casos donde el impacto de este último factor sobre la selectividad sea inapreciable, la reducción en el tiempo de análisis es aún una buena razón para tenerlo en cuenta.
- Para los compuestos ionizables, el pH es el factor con mayor efecto sobre la retención. Puesto que la retención de las especies ácidas y básicas ( $k_{HA}$  y  $k_A$ ) es distinta, se producen cambios repentinos en la retención cuando el pH de la fase móvil se halla cercana al logaritmo de la constante de protonación ( $\log K$ ) de cada compuesto. Además, los compuestos ionizables pueden exhibir grandes cambios en la selectividad, debido a la interacción del disolvente orgánico y/o la temperatura con el pH.
- Al incrementarse el contenido de disolvente orgánico o la temperatura, la caída en la retención con el pH se reduce, mientras que la anchura del salto (i.e. en la dirección del pH) mantiene la misma magnitud (alrededor de tres unidades de pH). Las regiones con fuerza eluyente demasiado baja asociadas a contenidos bajos de disolvente orgánico y/o baja temperatura, son demasiado inseguras desde un punto de vista práctico, debido a que originan grandes cambios en la retención, combinados con las incertidumbres usuales en la medida del pH.
- Se desarrolló un modelo de ocho parámetros capaz de considerar el efecto combinado del contenido de disolvente orgánico, el pH y la temperatura sobre la retención (Ecuación (5.13) en el Capítulo 5), y que permitió la estimación de las constantes de protonación en el medio hidro-orgánico a distintas temperaturas. El modelo posee una base teórica, lo que evita un ajuste demasiado flexible y disminuye la influencia de los datos anómalos. Además, le confiere una capacidad moderada para obtener información sobre la retención de las especies ácidas y

básicas, y poder extrapolar el comportamiento de retención a regiones externas próximas al diseño experimental. Para estos propósitos, las ecuaciones empíricas resultan inadecuadas, ya que únicamente son válidas en dominios estrechos de los factores, impidiendo por lo tanto el aprovechamiento de los beneficios del uso de tres factores con interacciones mutuas significativas.

- En la práctica cromatográfica, el uso del pH como factor posee la desventaja de que el mismo diseño experimental debe satisfacer los requisitos de información para solutos que exhiben comportamientos ácido-base distintos. Esto significa que mientras que el diseño puede resultar apropiado para muestrear la retención de algunos solutos, para otros, puede no existir información suficiente para permitir un ajuste adecuado. A pesar de ello, el modelo propuesto proporcionó predicciones exactas, incluso para aquellos compuestos deficientemente muestreados por el diseño experimental.
- El número de parámetros del modelo de tres factores es bastante económico: en teoría, ocho experimentos “perfectos” serían suficientes para realizar el ajuste, aunque esto supondría una ausencia de grados de libertad y una mayor influencia de los datos anómalos. Sin embargo, debido a los cambios repentinos en la retención con el pH y a la necesidad de muestrear adecuadamente compuestos con diverso comportamiento ácido-base, el número de datos experimentales necesarios para ajustar los modelos de retención debe ser significativamente superior al esperado a partir del número de coeficientes en el modelo de retención.
- El modelo de retención propuesto se obtuvo para compuestos monopróticos, y en principio, no es válido para compuestos polipróticos. Sin embargo, en muchos casos, la protonación secundaria no se manifiesta en la ventana usual de pH de trabajo 3–7, debido a la gran separación entre los valores de  $\log K$  sucesivos. Además, debe tenerse en cuenta que las especies cargadas (i.e. especies aniónicas) se hallan débilmente retenidas por las columnas de fase inversa.
- La exactitud de las predicciones del modelo de tres factores puede calificarse como ampliamente satisfactoria para ser utilizada en tareas de predicción, como las que se requieren en la optimización de la resolución.

- El contenido de disolvente orgánico posee un mayor efecto sobre el comportamiento ácido-base que la temperatura (al menos en los intervalos estudiados: 25–45% de acetonitrilo y 20–50°C), dando lugar generalmente a incrementos en  $\log K$ , ya que las especies neutras son más estables en ambientes menos polares. El efecto de la temperatura es mucho más variable. En algunos casos sólo produjo variaciones ligeras o uniformes de  $\log K$ , aunque excepcionalmente un cambio en la temperatura originó variaciones pronunciadas para algunos solutos.
- El factor más influyente sobre la eficacia es el pH (con un efecto perjudicial), seguido por el contenido de disolvente orgánico y la temperatura (ambos beneficiosos). Un mayor contenido de acetonitrilo tiende a hacer la fase móvil más parecida en polaridad a la fase estacionaria, así como más fluida, de la misma forma que ocurre operando a temperatura más elevada. Por lo tanto, no es sorprendente que la eficacia aumente en ambos casos.
- La fuerza eluyente asociada al contenido de disolvente orgánico y a la temperatura (medidas por los parámetros  $S_0$  y  $S_T$ , Ecuaciones (5.20) y (5.21) en el Capítulo 5) es positiva, lo que indica que incrementos en estos factores darán lugar a disminuciones en la retención. En el estudio realizado, la fuerza eluyente del disolvente orgánico fue siempre apreciablemente mayor que la de la temperatura.
- El efecto diferencial sobre la selectividad fue escaso para la temperatura, moderado para el contenido de disolvente orgánico y fuerte para el pH. Sin embargo, los efectos del contenido de disolvente orgánico y de la temperatura se magnifican por la interacción con el pH, puesto que el contenido de disolvente orgánico y la temperatura afectan al comportamiento ácido-base.
- Estos resultados sugieren que el pH es el factor más interesante para controlar la selectividad. Sin embargo, presenta dos desventajas prácticas. En primer lugar, para un determinado compuesto, el impacto sobre la selectividad queda restringido a la región de transición del pH (i.e. la región donde su fuerza eluyente es mayor), la cual es distinta para cada compuesto. En segundo lugar, la magnitud de las caídas de retención es tan intensa que el control del pH podría ser demasiado crítico para su uso práctico.



### **C.3.2. Beneficios de la optimización simultánea de los tres factores**

- Los resultados de la validación del modelo mecanicista propuesto en el Capítulo 5 sugirieron que puede ser utilizado en la predicción de la retención para la optimización de la resolución, considerando los tres factores: contenido de disolvente orgánico, pH y temperatura, así como sus interacciones mutuas.
- El conjunto seleccionado de compuestos ionizables permitió estudiar una situación desfavorable, donde sólo algunos compuestos ácidos débiles resultaron adecuadamente muestreados por el diseño experimental. Estudios publicados por otros investigadores que consideran el pH como factor son a menudo engañosos, ya que corresponden a situaciones irreales, en las que es posible observar la transición completa entre las especies ácidas y básicas. Esta situación es rara en la cromatografía real de muestras que contienen varios compuestos ionizables.
- Se utilizó una estrategia de optimización basada en el concepto de pureza de pico como función cromatográfica objetivo. Las purezas de pico se calcularon a partir de cromatogramas simulados, predichos mediante el modelo mecanicista de retención y utilizando modelos lineales locales para predecir las asimetrías de pico y las eficacias. Esta estrategia de optimización fue capaz de encontrar las condiciones experimentales más adecuadas para lograr la resolución completa en tiempos de análisis razonables.
- Las purezas de pico limitantes individuales para los compuestos de prueba alcanzaron el valor máximo  $p_{\text{lim},i} = 1$  (con solapamientos residuales por debajo de  $10^{-8}$ ). Esto significa que todos los solutos se resolvieron entre sí completamente hasta la línea base, al menos a una composición de la fase móvil.
- En general, el factor experimental más crítico fue el pH, que mostró las estructuras de pureza más estrechas de acuerdo con su mayor fuerza eluyente. Sólo se observaron unos pocos máximos estrechos (i.e. estructuras en el espacio de pureza  $T/\phi/\text{pH}$  con pequeñas proyecciones en el eje de pH), con una pureza de pico global óptima generalmente por debajo de  $P_{\text{opt}} = 0.9$ . El segundo factor crítico fue el contenido de acetonitrilo, cuyas proyecciones fueron más anchas. Finalmente, la temperatura fue la menos problemática bajo el punto de vista de la separación, ya que la velocidad de cambio en la selectividad fue inferior.

- La separación de los compuestos de prueba se vio claramente favorecida a pH bajo, especialmente por debajo de pH 4 y en una región intermedia estrecha. Por ello, a fin de incrementar la exactitud en la región de mayor resolución, se aconseja realizar una exploración exhaustiva a pH bajo.
- El efecto del contenido de acetonitrilo fue menos predecible que el efecto de la temperatura: se obtuvo una resolución pobre a contenidos de acetonitrilo elevados (i.e. sobre 40%), lo que era de esperar ya que una mayor fuerza eluyente favorece la co-elución. Sin embargo, también se observó una resolución pobre en una amplia región intermedia.
- La separación mejoró a temperaturas elevadas a pesar de la reducción en los tiempos de retención. Desafortunadamente, el instrumento utilizado no permitía dominios de temperatura más amplios de los ensayados.
- Se alcanzó la resolución completa en tiempos de análisis razonables únicamente en dominios estrechos del espacio de los factores. Estas regiones serían difíciles de localizar sin la ayuda de un riguroso algoritmo informático. Por otro lado, resolver problemas como el que aquí se muestra con combinaciones de sólo dos factores puede ser arriesgado, excepto si el tercer factor se fija a un nivel adecuado. La temperatura resultó realmente un factor útil, aunque su impacto en el intervalo accesible por el instrumento fue menor que el producido por el contenido de disolvente orgánico y el pH.
- Se comprobó la predicción de la resolución para dos condiciones experimentales situadas en las regiones óptimas. La concordancia entre los cromatogramas predichos y los experimentales fue satisfactoria, considerando el orden de elución, los tiempos de retención y la resolución. Sin embargo, en una de las condiciones que se comprobaron experimentalmente (a pH = 4.12), cinco solutos mostraron valores de  $\log K$  cercanos al pH de la fase móvil. Esto explica, al menos parcialmente, los desplazamientos de los picos para los cuatro solutos más retenidos con respecto a los valores predichos. El valor de  $\log K$  para la piretanida coincidió virtualmente con el pH de la fase móvil, y en consecuencia, la predicción de su tiempo de retención fue muy crítica.

## C.4. Comportamiento cromatográfico de una columna Chromolith RP-18e para el análisis de $\beta$ -bloqueantes

### C.4.1. Optimización interpretativa del contenido de disolvente orgánico y del flujo

- Teóricamente, los factores de retención ( $k$ ) son independientes del flujo. En consecuencia, es de esperar que la relación cuadrática clásica entre  $\log k$  y el contenido de disolvente orgánico (Ecuación (7.1) en el Capítulo 7) prediga los tiempos de retención a cualquier combinación de contenido de disolvente y flujo, utilizando un marcador de tiempo muerto adecuado. Sería así posible obtener los coeficientes de la Ecuación (7.1) a partir de medidas llevadas a cabo a un flujo fijo, pero también a partir de medidas a diferentes contenidos de disolvente orgánico y flujos.
- Se comprobó la exactitud de las predicciones de la Ecuación (7.1) con un conjunto de 10  $\beta$ -bloqueantes utilizados como compuestos de prueba, cromatografiados con una columna Chromolith Performance RP-18e. Para los  $\beta$ -bloqueantes más retenidos, las predicciones a diferentes flujos no fueron completamente satisfactorias, aunque las desviaciones observadas pudieron ser corregidas incluyendo un término adicional en la Ecuación (7.1) que correlacionaba linealmente  $\log k$  con el flujo (Ecuación (7.6)).
- Los gráficos del tiempo de retención frente a la inversa del flujo ( $t_R$  vs.  $1/F$ ) mostraron una tendencia lineal ( $R > 0.9999$ ) para todos los compuestos de prueba. Idealmente, estas líneas deberían exhibir intersecciones nulas y las pendientes deberían coincidir con el tiempo de retención a  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Sin embargo, para los compuestos más retenidos, el ajuste de las líneas rectas dio lugar a intersecciones significativas que se correlacionaron positivamente con su hidrofobicidad. Estas intersecciones positivas pueden ser la razón principal de que los tiempos de retención no se dividan exactamente a la mitad cuando se duplica el flujo. Como consecuencia, se produce un sesgo: los factores de retención para los compuestos más retenidos dependen del flujo. En otras palabras, la representación de  $k$  frente al flujo para un contenido de acetonitrilo constante muestra una pendiente en lugar de permanecer invariable (i.e. pendiente nula).

- Se utilizaron dos métodos para determinar el tiempo muerto: la detección de la primera perturbación de los cromatogramas y el máximo del pico de un marcador (uracilo). En ambos casos, se comprobó que los valores de tiempo muerto eran independientes de la composición de la fase móvil, con desviaciones estándar relativas por debajo del 2%. Sin embargo, la medida del tiempo muerto con uracilo resultó más correcta, ya que con este marcador las ordenadas en el origen de los gráficos de  $t_R$  vs.  $1/F$  fueron casi nulas.
- Se encontraron relaciones aproximadamente lineales entre las semianchuras de los picos cromatográficos y los tiempos de retención, con coeficientes similares para picos que eluían a composiciones de fase móvil variable y flujo fijo, o a una composición fija y flujo variable. Esto permitió una predicción simple del perfil de pico y de la resolución.
- Cuando se incrementó el flujo a una composición de fase móvil fija, se mantuvo la distribución de los picos, pero las anchuras relativas de cada pico se incrementaron (i.e. la eficacia se deterioró). Por lo tanto, la resolución se redujo hasta valores insatisfactorios para compuestos con elución próxima.
- Con seis condiciones experimentales (i.e. datos medidos a tres composiciones de fase móvil, cada una a dos flujos), pueden obtenerse todos los coeficientes del modelo de retención (Ecuación (7.6)) con suficiente exactitud. Otra posibilidad para desarrollar el modelo es trabajar a flujo relativamente bajo (a  $1 \text{ ml min}^{-1}$  con los datos obtenidos a tres o cuatro composiciones de la fase móvil), y llevar a cabo medidas adicionales a otro flujo utilizando la fase móvil óptima, ya que las estructuras de resolución son prácticamente paralelas en la dirección del flujo.
- Se predijo la resolución total ( $P_{\max} = 0.99$ ) para un conjunto de nueve  $\beta$ -bloqueantes en una amplia región del dominio experimental, que se estrechaba al incrementarse el flujo, debido al solapamiento de los dos compuestos menos retenidos. Este solapamiento progresivo puede explicarse por la reducción en las eficacias a flujo más elevado.

- La exactitud de las predicciones se demostró por comparación de los cromatogramas experimentales y predichos para una mezcla de  $\beta$ -bloqueantes eluidos con acetonitrilo al 13.3% y flujos de 1 y 5 ml min<sup>-1</sup>, y utilizando una condición experimental fuera del diseño experimental (6 ml min<sup>-1</sup>). La concordancia fue muy satisfactoria en todos los casos.

#### **C.4.2. Comparación de una columna Chromolith RP-18e con columnas de micropartículas**

- Se comparó exhaustivamente el comportamiento cromatográfico de una columna monolítica de base sílice (Chromolith Performance RP-18e) con el de tres columnas de micropartículas utilizadas en fase inversa, fabricadas con distintos tipos de sílice: Spherisorb ODS-2 (tipo A), Kromasil C18 (tipo B) y XTerra MS C18 (tipo B combinada con metilsilano). Las columnas de tipo A son más ácidas que las de tipo B, debido a la presencia de silanoles libres y de metales (e.g. Fe y Al) en la matriz de sílice.
- El estudio se realizó a 1 ml min<sup>-1</sup> con una mezcla de nueve/diez  $\beta$ -bloqueantes, que son fármacos básicos. Esta característica permitió explorar la actividad de los silanoles en cada columna. Se consideró el tiempo de análisis, la selectividad, el perfil de pico (eficacia de la columna y asimetría), la resolución y la posibilidad de transferir los resultados entre las columnas, para un intervalo amplio de composiciones de fase móvil. Esto difiere de estudios previos, que se han realizado para una única composición de fase móvil.
- La columna Chromolith ofreció propiedades favorables en comparación a las otras columnas examinadas para el análisis de  $\beta$ -bloqueantes. Esta conclusión contrasta con comentarios previos sobre los problemas que existen con las columnas Chromolith para el análisis de compuestos básicos.
- El orden de elución de los  $\beta$ -bloqueantes fue el mismo para las columnas Chromolith, Kromasil y XTerra. Oxprenolol y labetalol cambiaron su orden de elución en la columna Spherisorb, y timolol dio lugar a diferentes órdenes de elución en las distintas columnas.

- Utilizando fases móviles de acetonitrilo-agua, la mayor similitud en términos de tiempo de análisis y selectividad se encontró entre las columnas Chromolith y XTerra (exceptuando la fase móvil de acetonitrilo al 25%), la última con mejores perfiles de pico.
- Es posible realizar una transferencia apropiada de los resultados a la columna Chromolith Performance RP-18e desde las columnas XTerra y Kromasil, especialmente para la primera. La transferencia es posible en un amplio intervalo de composiciones de la fase móvil.
- Se observó que las semianchuras de pico de los  $\beta$ -bloqueantes correlacionaban satisfactoriamente con los tiempos de retención. La mayor pendiente para la semianchura derecha indicó que los picos tienen tendencia a eluir con cola en todas las columnas. La columna XTerra proporcionó picos prácticamente simétricos. La mayor asimetría correspondió a las columnas Spherisorb y Chromolith.
- Una mezcla de nueve  $\beta$ -bloqueantes (timolol, que solapaba con acebutolol y metoprolol, no se incluyó) mostró una buena resolución para un amplio intervalo de composiciones, presentando la columna Spherisorb la situación más crítica, seguida de la columna Kromasil. La resolución fue casi completa en todo el intervalo de condiciones de trabajo para la columna XTerra. Sin embargo cuando se incluyó en la mezcla el timolol, únicamente la columna Chromolith fue capaz de resolver (y tan sólo parcialmente) los picos críticos (timolol, acebutolol y metoprolol).
- Con las columnas Chromolith y Spherisorb, la adición de trietilamina (TEA) a la mezcla de acetonitrilo-agua dio lugar a los siguientes efectos:
  - Una reducción importante en los tiempos de retención para la columna Spherisorb, mientras que el cambio fue mínimo para la Chromolith.
  - El orden de elución fue el mismo para ambas columnas, y distinto al encontrado en ausencia de TEA.
  - Una mejora en el perfil de pico para ambas columnas (Chromolith y Spherisorb). Además, tanto la eficacia de la columna como la asimetría se hicieron similares al adicionar TEA. Ello puede indicar que se alcanza el

mismo grado de bloqueo de los grupos silanol para ambas columnas en presencia de TEA.

- Selectividades similares para las columnas Chromolith y Spherisorb en una región amplia de los dominios experimentales.
- En contraste con otras columnas, las columnas Chromolith y Spherisorb alcanzaron con éxito la separación de los pares críticos a un contenido de acetonitrilo bajo, siendo el tiempo de análisis inferior para la primera columna. Los pares críticos no se resolvieron para las columnas XTerra y Kromasil.

### C.5. Estimación de $\log P_{o/w}$ mediante un nuevo método cromatográfico

- Un estudio previo de las relaciones cuantitativas estructura-propiedad (QSPR, *Quantitative Structure-Property Relationships*) demostró que la polaridad de un soluto, definida mediante el parámetro  $p$  desarrollado por Bosch *et al.* (Ecuación (9.10) en el Capítulo 9), puede describirse mediante la combinación del logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log P_{o/w}$ ) y cuatro descriptores calculados a partir de la estructura del soluto: dos descriptores electroestáticos, un descriptor químico-cuántico y un descriptor que define las posibles interacciones intermoleculares por enlaces de hidrógeno (Tabla 9.1).
- Se propone aquí la estimación de  $\log P_{o/w}$  para distintos tipos de soluto a partir del parámetro de polaridad  $p$ , utilizando el modelo QSPR anteriormente descrito (Ecuación (9.17)). Para ello, se utilizaron datos de retención obtenidos con dos columnas (Luna C18 y Chromolith Performance RP-18).
- Para realizar el cálculo de  $\log P_{o/w}$ , es necesario que el valor de  $p$  para cada soluto corresponda al sistema en el cual se estableció el modelo QSPR (columna Spherisorb ODS-2 y fases móviles de acetonitrilo-agua). Con este propósito, es interesante indicar que los valores de  $p$  determinados en un sistema cromatográfico particular pueden correlacionarse linealmente con los obtenidos en otro sistema. Los coeficientes de las ecuaciones de transferencia desde los sistemas cromatográficos ensayados (Luna C18 y Chromolith, y acetonitrilo y

metanol como modificadores) al sistema de referencia se establecieron con los conjuntos de valores de  $p$  de 12 compuestos seleccionados en estudios previos.

- Se tuvo en cuenta la variación de ambos pH y  $pK_a$  al añadir acetonitrilo o metanol al tampón acuoso, para asegurar que los solutos se encontraban en su forma neutra al pH de la fase móvil, ya que el modelo de polaridad considera que los solutos se encuentran en esta forma.
- Para los compuestos poco retenidos, pequeñas fluctuaciones en el valor del tiempo muerto pueden afectar al valor de  $\log k$ , y finalmente, al valor de  $\log P_{o/w}$  estimado. Esto fue especialmente crítico para las mezclas de acetonitrilo-agua.
- La representación de los valores de  $\log P_{o/w}$  calculados frente a los de referencia para la columna Luna C18 mostraron que:
  - Permite la medida cromatográfica de la hidrofobicidad en un amplio intervalo, desde compuestos muy hidrofílicos (i.e.  $\log P_{o/w} < 0$ ) hasta compuestos altamente hidrofóbicos (i.e.  $\log P_{o/w} = 6$ ).
  - Los mejores resultados se obtuvieron para contenidos de acetonitrilo en el intervalo 40–60%. El número de compuestos con comportamiento anómalo (i.e. compuestos que presentaron diferencias entre los valores de  $\log P_{o/w}$  estimado y de referencia superiores a 0.6 unidades logarítmicas) fue superior en la fase móvil que contenía 60% de acetonitrilo. En muchos casos, se trata de compuestos poco retenidos, para los que la exactitud en el valor de  $\log k$  calculado fue insuficiente.
  - La dispersión en los resultados fue mayor cuando se utilizó metanol como disolvente orgánico. Las mejores correlaciones se obtuvieron trabajando con contenidos de metanol del 50–60%.
- La representación de los valores de  $\log P_{o/w}$  estimados frente a los de referencia para la columna Chromolith RP-18e mostraron que:
  - La posibilidad de trabajar a flujos más altos (en nuestro caso,  $2 \text{ ml min}^{-1}$ ) permite la determinación de  $\log P_{o/w}$  para compuestos altamente hidrofóbicos, llegando a valores de  $\log P_{o/w} = 7$ . En cambio, esta columna no resultó adecuada para compuestos muy hidrofílicos.



- Las mejores correlaciones correspondieron a fases móviles con un contenido de acetonitrilo del 50–60%, con la desventaja de encontrar un número significativo de compuestos con comportamiento anómalo, especialmente al 60% de acetonitrilo. La dispersión de los resultados, una vez eliminados los valores anómalos, fue pequeña y del mismo orden que la obtenida para la columna Luna C18, pero se incrementó ligeramente al aumentar el contenido de acetonitrilo en la fase móvil.
- La dispersión de los resultados al utilizar metanol como modificador orgánico fue similar a la obtenida con acetonitrilo. Las mejores correlaciones correspondieron a contenidos de metanol en el intervalo 50–70%, aunque el término independiente fue ligeramente negativo, dando lugar a una pequeña desviación en las predicciones de  $\log P_{o/w}$ .
- El método propuesto se basa en la caracterización de la polaridad del soluto mediante un único parámetro  $p$ . Este modelo de polaridad es adecuado para la mayoría de compuestos con estructuras relativamente sencillas, para los que el parámetro  $p$  no depende de la composición de la fase móvil. Sin embargo, existen algunos compuestos con estructura más compleja, para los que los valores de  $p$  calculados aumentan o disminuyen significativamente al variar el contenido de disolvente orgánico en la fase móvil. Por lo tanto, para estos compuestos se necesitaría un segundo parámetro caracterizador que contemple otras interacciones también presentes en la columna (e.g. enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals u otras interacciones intramoleculares). Éste es el motivo por el que estos compuestos proporcionan valores de  $\log P_{o/w}$  anómalos para fases móviles con contenidos de modificador orgánico bajos o elevados, aunque a contenidos de modificador intermedios se obtienen resultados aceptables.
- Por lo tanto, es preferible trabajar con contenidos de modificador orgánico intermedios para evitar el efecto de las variaciones lineales (ascendentes o descendentes) del parámetro de polaridad del soluto  $p$  para algunos compuestos complejos. En el caso de compuestos muy hidrofílicos, es aconsejable trabajar con contenidos bajos de modificador orgánico para evitar valores de  $\log k$  muy bajos (i.e. con tiempos de retención cercanos al tiempo muerto).

- Se obtuvieron mejores resultados con fases móviles de acetonitrilo-agua, considerando tanto la dispersión de los datos como la bondad de las rectas obtenidas. Esto coincide con las conclusiones publicadas por Valkó *et al.* sobre la medida del parámetro de hidrofobicidad CHI y su posterior correlación con  $\log P_{o/w}$ , donde los mejores resultados se obtuvieron con acetonitrilo.
- El método propuesto no hace uso directo de la retención cromatográfica para estimar  $\log P_{o/w}$ , sino que atiende también a propiedades del compuesto relacionadas con su estructura química. Se trata de un método experimental que puede ser utilizado para compuestos de nueva síntesis, para los que no existen congéneres homólogos de polaridad conocida, y es válido en sistemas cromatográficos diversos.

## **EUROPEAN DOCTORATE MENTION**

### **“Doctor Europeus”**

#### **Fundamental studies on the performance of reversed-phase liquid chromatography**

### **REQUIREMENTS**

1. The mention “Doctor Europeus” can be included in the obverse of the doctoral degree if the following conditions have been met:
  - (a) The candidate, during the official postgraduate program, must take courses or undertake research, recognised by the institution responsible for the official postgraduate program, for at least three months in an institution of higher education of another European country.
  - (b) Part of the doctoral thesis, at least the summary and the conclusions, must be written and defended in an official language of a European country, other than the official languages in Spain.
  - (c) The doctoral thesis must have been informed by a minimum of two experts belonging to higher education institutions or research institutes of European Union countries, other than Spain.
  - (d) At least one expert, with a doctoral degree, different of the two mentioned in (c) and belonging to a higher education institution or research institute of a European Union country other than Spain, must be a member of the Board of Examiners.
2. The defense of the thesis must be made at the Spanish university where the candidate is enrolled.

## OBJECTIVES AND DEVELOPMENT OF THE RESEARCH WORK

The success of a chromatographic separation resides in reaching a differential interaction of solutes with the stationary phase, what is achieved by controlling the most accessible experimental factors. Usually, the resolution requirements are specific of each solute and, frequently, the improvement in the separation of some of them implies impoverishing the separation of others. Therefore, achieving a compromise that allows the resolution of a complex mixture can be an arduous problem that cannot be approached by trial and error. It has been demonstrated that the most efficient way of approaching an optimisation in liquid chromatography is the use of strategies based on models that predict the resolution.

Fundamental studies are essential to improve the possibilities of chromatographic systems. In spite of the interest that many researchers have shown for these studies, there are still several essential aspects that need some revision or development. In this Thesis, some of them have been approached:

(i) *The estimation of the dead time:*

“the volume of mobile phase that fills the space between the injector and the detector cell, which includes the accessible interstitial volume and the intraparticulate volume in the stationary phase, as well as the volume of tubing and any other components in the system”,

to which diverse and serious difficulties are associated, not existing a generally accepted method for its accurate evaluation yet. The suitability of two different methods were revised (the use of dead time markers and the homologous series method), and a new method was proposed that uses the retention data of the solutes (at different mobile phase composition) for which the knowledge of the dead time is required. Consequently, it considers the specific accessibility of the solutes in the estimation.

(ii) *The estimation of the peak capacity:*

“maximum number of resolved peaks in a given time window”

which is a parameter that has recently called some attention to evaluate the potential of global separation for a chromatographic system, especially in two-dimensional

configurations. However, the peak capacity is only accessible through calculation. The different approaches to estimate the peak capacity were analyzed, and several modifications that consider real chromatographic peaks, where width, asymmetry and efficiency depend on the retention time, were proposed.

- (iii) *The combined effect of the three most important experimental factors in liquid chromatography (organic solvent content, temperature and pH) on the retention of ionisable solutes*, together with the effect of the two former factors on the acid-base behaviour. The study led to the proposal of a new retention model that was applied to examine in detail the chromatographic behaviour of the solutes and develop an optimisation strategy.
- (iv) *Rapid chromatography* with a silica-based monolithic column at high flow-rate, for which an optimisation strategy developed for conventional chromatography was adapted. This has allowed the prediction of the separation at diverse mobile phase compositions and flow-rates. The topic that, in principle, should be simple since the definition of capacity factor should make this parameter independent of the flow-rate, is complicated by the difficulty in its control at diverse mobile phase compositions.
- (v) *The comparison of chromatographic columns* that traditionally is carried out based on their selectivity and efficiency at a selected mobile phase composition, or at a reduced number of mobile phase compositions. A methodology that allows an exhaustive comparison in wide mobile phase composition ranges is shown, which considers the analysis time, selectivity, peak shape and resolution, as well as the possibility of transferring the results among columns.
- (vi) *The evaluation of the hydrophobicity of organic compounds* that makes use of a parameter measuring the polarity of solutes ( $p$ ). The octanol-water ( $\log P_{o/w}$ ) was estimated using retention data obtained with diverse columns through their transfer to a reference system, for which the correlation between  $p$  and  $\log P_{o/w}$  has been modelled.

The work here presented has implied a large experimental development, designed to explore and extract information on the chromatographic behaviour of diverse compounds in different columns and experimental conditions (organic solvent content, pH, temperature and flow-rate), as well as an extensive treatment of the data, mainly related with the construction of models to predict the retention, the chromatographic peak shape and the resolution of mixtures of compounds, everything with optimisation purposes.

The research work has been carried out with compounds of diverse nature (diuretics,  $\beta$ -blockers, alkylbenzenes, phenols, among many others), eluted with hydro-organic mobile phases of acetonitrile- and methanol-water, using reversed-phase chromatographic columns with diverse characteristics. In some cases, for which additional information was needed, the database of the research group, or data from the literature, was used.

The large effort done in the literature survey of the different topics should be remarked. This has implied the search, reading and organisation of a lot of valuable information that is largely reflected in each one of the articles developed for this Thesis. During the PhD. period (September of 2006–September of 2009), most work was developed in the Department of Analytical Chemistry in the University of Valencia, but it has also included two stays in the laboratories of the van't Hoff Institute for Molecular Sciences in the University of Amsterdam (The Netherlands), under the supervision of Professor Peter Schoenmakers, and at the Department of Analytical Chemistry in the University of Barcelona, under the supervision of Professor Elisabeth Bosch. The first stay supposed the introduction in bi-dimensional chromatography and the second approached quantitative structure-property relationships (QSPR).

It should be indicated that owing to the official time schedule, the described work has been finished five months before the PhD. dissertation. Therefore, it was not possible to include some research work for which an article draft is still being prepared or for which an extensive experimental work has been done. Next, the complete list of research topics carried out during the PhD. period is indicated.

**Scientific communications**

1. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, “*Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition on the chromatographic separation of ionisable compounds*”. VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Vigo (Spain), November, 2006.
2. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, “*Variation of peak shape in HPLC as a function of pH, temperature and modifier*”. VI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Vigo (Spain), November, 2006.
3. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza M.C. García Álvarez-Coque, “*Benefits of temperature to control selectivity and retention of ionisable compounds in RPLC separations*”. 31st International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2007, Gante (Belgium), June, 2007.
4. W.M. Decrop, S. Pous Torres, H.J.A. Philipsen, P.J. Schoenmakers, “*Comparison of different modes of LCxLC for separating a branched polyester*”. 31st International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2007, Gante (Belgium), June, 2007.
5. S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, “*Peak capacity estimation for asymmetrical peaks following the Giddings’ approach*”. 27th International Symposium on Chromatography, Münster (Germany), September, 2008.
6. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, “*Reversed-phase surfactant-mediated chromatographic separations of cationic solutes*”. 27th International Symposium on Chromatography, Münster (Germany), September, 2008.

7. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *"Evaluation of a monolithic column for the screening of  $\beta$ -blockers"*. 27th International Symposium on Chromatography, Münster (Germany), September, 2008.
8. J. M. Pallicer, S. Pous Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *"A new chromatographic method to determine the hydrophobicity of organic compounds"*. 27<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography, Münster (Alemania), September, 2008.
9. J. M. Pallicer, S. Pous Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *"Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as  $\log P_{o/w}$  values through a new chromatographic method"*. Log P'2009 –PhysChem and ADMET Profiling in Drug Research. The 4th Log P Symposium, Zurich (Switzerland), February, 2009.
10. M.C. García Álvarez-Coque, S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, *"A novel approach to estimate octanol-water partition coefficients using silica-based monolithic columns"*. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June-July, 2009.
11. M.C. García Álvarez-Coque, S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, *"Approaches for peak capacity estimation in isocratic elution"*. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June-July, 2009.
12. M.C. García Álvarez-Coque, S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, *"Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of  $\beta$ -blockers"*. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June-July, 2009.
13. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *"Alternating iterative regression method for dead time estimation from experimental designs"*. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June-July, 2009.



14. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *“Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of basic drugs with a Chromolith RP-18e column”*. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June-July, 2009.
15. J.R. Torres Lapasió, S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *“Considerations about robustness in the optimisation of the separation of ionisable compounds combining the effect of solvent content, temperature and pH”*. 34th International Symposium on High-Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques, HPLC 2009, Dresden (Germany), June-July, 2009.

## Articles

1. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez Coque; *“Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds”*  
Journal of Chromatography A 1163 (2007) 49–62.
2. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *“Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. II: Benefits of the simultaneous optimisation”*  
Journal of Chromatography A 1193 (2008) 117–128.
3. S. Pous Torres, J.J. Baeza Baeza, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *“Peak capacity estimation in isocratic elution”*  
Journal of Chromatography A 1205 (2008) 78–89.
4. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *“Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography”*  
Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 32 (2009) 1065–1083.

5. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *“Iterative method for dead time estimation from optimisation experimental designs using alternating regression and sequential elimination of retention times”*  
Analytical and Bioanalytical Chemistry 394 (2009) 625–636.
6. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *“Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of  $\beta$ -blockers with a Chromolith RP-18e column”*  
Journal of Separation Science (en prensa).
7. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.J. Ruiz Ángel, M.C. García Álvarez-Coque, *“Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of  $\beta$ -blockers”*  
Journal of Separation Science (en prensa).
8. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *“Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. III: Considerations about robustness”*  
Sent for publication.
9. J. M. Pallicer, S. Pous Torres, J. Sales, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *“New approach to determine the hydrophobicity of organic compounds based on a polarity parameter”*  
In preparation.
10. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *“A reliable predictive tool of the resolution of ionisable compounds in RPLC”*  
In preparation.
11. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, J.J. Baeza Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *“Efficiency measurement”*  
In preparation.
12. W.M. Decrop, S. Pous Torres, H.J.A. Philipsen, P.J. Schoenmakers, *“Comparison of different modes of LCxLC for separating a branched polyester”*  
In preparation.

13. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *“Consequences of flow-rate inaccuracy in liquid chromatography”*  
In preparation.
14. S. Pous Torres, M.J. Ruiz Ángel, A. Vicent Claramunt, M.C. García Álvarez-Coque, *“Reproducibility of stationary phase behaviour by addition of surfactant to the mobile phase”*  
Experimental work.
15. S. Pous Torres, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque, *“Rapid analysis of phenols using ultra-high pressure liquid chromatography”*  
Experimental work.

## **SUMMARY**

### **Chapter 1**

#### **Introduction**

High-performance liquid-chromatographic separations can be approached from two perspectives, namely isocratic and gradient elution. Isocratic elution presents some advantages, such as greater simplicity, lower cost, simpler instrumentation, and no need of column re-equilibration between consecutive injections. However, its practical utility is seriously restricted to sets of compounds in a relatively narrow range of polarities. If the polarity range is too wide, it will be difficult to find a set of chromatographic conditions able to balance a satisfactory separation power for the least retained solutes, and a reasonable elution time for the most retained ones. A logical solution to overcome such a situation is gradient elution, where the elution strength is increased gradually by altering at least one experimental factor as the analysis progresses, so that the elution of the most retained compounds is expedited.

When the chromatographer tackles a new problem, some decisions concerning non-adjustable factors (e.g. column, organic solvent and buffer nature) should be taken, often through screening or based on prior knowledge. Then, readily adjustable properties are examined, such as the concentration of organic solvent, pH, temperature, or the gradient program where one or more of these factors are varied. When the results are not satisfactory, a major change in the chromatographic system (i.e. the column and/or the mobile phase components) is required. This means more experimental work, more cost and an undesirable delay in method development. In the new system, some previously overlapped compounds may be now better resolved, but others which were formerly well resolved may co-elute.

This panorama suggests that finding the best separation conditions is not easy. Several optimisation strategies have been proposed to assist the resolution of complex problems. In spite of being particularly slow and inefficient, trial-and-error strategies are still frequent. Many mixtures are, however, so complex that they cannot be solved by these strategies. Fortunately, method development can be notably expedited with more reliable results by applying computer-assisted interpretive optimisation.

Experiment-based optimisations include two steps: modelling of the system and prediction of the resolution through computer simulation. In the first step, the chromatographer develops a number of experiments as reduced and informative as possible, in order to fit equations or train algorithms that will allow the prediction of retention, and incidentally, other properties that summarise a chromatogram. The aim is to develop systems capable of predicting the separation at any new arbitrary condition. In the second step, the separation quality is scanned for a large number of separation conditions, and the one that is expected to give maximal resolution is selected. In practice, this is done by simulating the chromatograms for a pre-fixed distribution (regular or chosen on a random basis) of the experimental factors being optimised. For this purpose, synthetic chromatograms are built by adding the predicted signals for the compounds in the analysed mixture.

In order to find the best conditions, the information contained in the simulated chromatograms should be transformed to a numerical value, which is monitored throughout the optimisation. Ideally, this value should correlate with the analyst's appraisal of resolution. The mathematical expression that allows the evaluation of the separation quality is called "objective function", which is maximised throughout the optimisation process. Usually, the objective function only considers the resolution, but it may gather additional aims, more or less subjective, such as shorter analysis time or desirable peak profiles (i.e. high efficiencies and low asymmetries).

The number of optimised factors should be as reduced as possible. Very often just one factor (e.g. the concentration of organic solvent in isocratic elution) is enough to succeed in the separation. The optimisation of two or more factors is less frequent (e.g. the concentration of organic solvent and pH or temperature, or the concentrations of two modifiers and pH), due to the increased experimental effort needed to achieve accurate predictions. Gradient elution implies finding the suitable gradient program, which is usually, numerically speaking, more complex. This can be carried out in many ways, depending on the selected factors that determine the gradient profile: gradient time, gradient shape and initial value of the experimental factor(s).

## Chapter 2

### **Performance of markers and the homologous series method for dead time estimation in reversed-phase liquid chromatography**

Two methods for dead time estimation (the use of markers and the homologous series mathematical method) were revised. Out of twelve assayed common markers, only KBr, KI, tartrazine, thiourea, uracil and urea yielded retention times independent of the mobile phase composition in the range 10–90% acetonitrile, using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column. The small differences among these markers should be attributed to their different accessibility to the column pores and the existence of residual interactions. The selection of a marker is risky and requires checking that changes in mobile phase composition do not affect the dead time estimation.

Dead time estimations derived from the homologous series approach depended on the mobile phase composition. This was explained as a consequence of the different retention time ranges included in the fittings. The quality of the estimations provided by this method is limited by the mathematical approach and the data quality. The dead time is an extrapolated value, severely affected by the data of the most retained compounds that act as leverage points, biasing the result.

The sequential elimination of the highest homologous (i.e. the most retained compounds) attenuates this problem, converging towards consistent dead time estimations. However, this strategy is limited by the nature of the selected homologous series, which ideally should include at least four compounds with low retention. From the two assayed series (nitrosamines and alkylbenzenes), only the former was appropriate.

The use of relationships retention *versus* composition undergoes a similar problem: the estimation is more or less biased depending on the magnitude of the retention. In some cases, due to the narrow variability of retention times with mobile phase composition, or the inaccuracy in the retention times or organic solvent contents, the individual fittings of models relating  $\log k$  with organic solvent content yield strong biases. These results suggested that the simultaneous treatment of all available information (the data from several compounds and mobile phase compositions) could be beneficial.

## Chapter 3

### Iterative method for dead time estimation from experimental designs

An indirect method for dead time ( $t_0$ ) estimation in RPLC, based on a relationship between retention time and organic solvent content (Eq. (3.7) in Chapter 3) is proposed. The method processes the retention data (obtained in experimental designs) of compounds of any kind, without any special requirement except that they should not be excessively retained in the working conditions. The method requires a range of experimental conditions where the retention of the assayed compounds changes with mobile phase composition, but the column dead time is negligibly affected. In order to get more general validity and enhance the accuracy, the information from several compounds is used altogether in an alternating regression fashion.

Similarly to the homologous series method, in the proposed method the dead time is determined by extrapolation. Consequently, the estimations are affected by the magnitude of the fitted retention times. Ideally, these two methods should be applied to solutes showing sufficiently low retention (e.g.  $t_R < 5t_0$ ). However, when the retention time matrix includes initially inappropriate values, in combination with the sequential elimination of the longest retention times, convergence in consistent results is achieved.

In some cases, due to a narrow variability of the retention times with mobile phase composition or inaccurate retention times, the individual fittings of the retention model (Eq. 3.7) can yield strong biases at the beginning of the iterative process, which will produce a slow convergence. This bias, nevertheless, can be compensated along the iterations, yielding finally a satisfactory estimation.

The method assumes that the measured void volume is the space accessible to solutes during their chromatographic elution. This definition may imply that different solutes have different associated dead times. However, the differences seem to be negligible at least when solutes of similar nature elute in reasonably narrow retention windows. Ideally, the method works the best in relatively narrow ranges of organic solvent content, where the linear approximation (Eq. (3.4)) is best suited. The sequential elimination of the longest retention times diminishes the impact of incidental changes in the solvation

layer with mobile phase composition, and favours the validity of the linear approximation.

The only need of the method is the availability of retention data for two or more compounds at three or four mobile phase compositions. It requires some basic mathematical and programming knowledge. However, since there is no need of user interaction, once the software application is developed, a totally untrained user can run it. The method can be implemented easily, since the only non-linear fittings required are the ones involved in the first step of the algorithm. The loops in the steps included in the iterations involve simple linear regressions. These calculations can even be implemented in a scientific calculator with programming facilities.

The method is well suited for optimisation purposes, since it allows dead time estimation using the retention times of the same compounds that are being separated. This means that the retention factors will be calculated with a dead time value estimated considering the accessibility of the target compounds, avoiding the use of external compounds.

The method was applied to nitrosamines, alkylbenzenes, phenols, benzene derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons,  $\beta$ -blockers, among other compounds, chromatographed in a cyano and several C18 columns. A comprehensive validation was carried out by comparing the results with those provided by the injection of markers, the observation of the solvent front, and the homologous series method. It was also found that different groups of compounds yielded the same dead time value with the same column, which was verified in different solvent composition windows.



## Chapter 4

### Peak capacity estimation in isocratic elution

Peak capacity (maximal number of resolved peaks that fit in a chromatographic window) is a useful concept, with growing interest, but it can be only accessible through calculation, since it is based on a situation rarely met in practice: a chromatogram with well distributed peaks and resolved without gaps. Also, proper peak capacity estimation requires knowledge on how peak width changes with retention time.

Several equations have been reported for the estimation of peak capacity in isocratic elution, which are based on three perspectives: the intuitive approach (peak capacity as the size of the retention time window measured in peak width units), which assumes peaks with the same width, and the outlines of Grushka and Giddings, which consider changes in peak width with retention time. In these approaches, the efficiency is assumed to be kept unchanged with retention time. This assumption may yield biased estimations.

The peak capacity concept is here discussed and three new approaches are proposed based on realistic descriptions of peak shape. The first one is based on the Grushka's approach and considers the contributions of column and extra-column peak variances (Eq. (4.31) combined with Eqs. (4.32), (4.33) and (4.34) in Chapter 4). The second approach relies on Giddings' and assumes asymmetrical peaks, where left and right peak half-widths depend linearly on retention time (Eq. (4.48)). The third one, based on the intuitive approach, uses a mean peak width obtained by integration, instead of a mean value from several representative peaks (Eq. 4.56). Measurement of peak width was made at 10% peak height to account peak deformation better.

It should be noted that the final equation derived from the modified Giddings' approach coincides with that obtained with a previous modified Grushka's approach (Eq. (4.23)), where a linear approximation between standard deviation and retention time is assumed.

A proper inclusion of changes in peak width with retention time is not straightforward for either modified Giddings' and Grushka's approaches. On the one hand, the equation relating the total peak variance ( $\sigma_{\text{tot}}^2$ ) with  $t_R^2$  is not compatible with Giddings', and approximate linear equations between each half-width and retention time should be used.

The magnitude of the curvature of the parabola depicted by  $\sigma_{\text{tot}}$  versus  $t_R$  seems to be, however, rather small and can be assimilated to a straight-line. On the other hand, the estimation of the standard deviation for an asymmetrical peak is not straightforward, and different approximations should be used. We have applied three alternatives in this work, two of them (Eqs. (4.33) and (4.34)) yielded accurate estimations of peak capacity.

The equations previously proposed for peak capacity estimation, which incorporated the dependence of efficiency with retention time were outlined based on the Grushka's approach. These equations, together with the modified approach developed for this work, do not allow including peak skewness as the Giddings' approach. However, the peak width and not the skewness seem to be the relevant factor, at least in the studied examples. Nevertheless, in other situations (such as the case of highly distorted electrophoretical peaks), asymmetry could be a key factor.

Real chromatograms following the definition of peak capacity are not easy to find. The accuracy of the classical Giddings' approach for ideal peaks, a modification of the Grushka's approach that considers variation of peak width at half-height, and the three new approaches were checked by comparison with synthetic chromatograms, built by adding real peaks. The new Grushka's and Giddings' approaches gave highly satisfactory estimations.

## Chapter 5

### **Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds**

The organic solvent content and pH in the mobile phase are the usual main factors in RPLC separations, owing to their strong effects on retention and/or selectivity. Temperature is often neglected. However, even in cases where the impact of this factor on selectivity is minor, the reduction in analysis time is still an interesting reason to consider it. In addition, ionisable compounds may exhibit selectivity changes, owing to the interaction of organic solvent and/or temperature with pH.

The separation of ionisable compounds (nine diuretics: bendroflumethiazide, benzthiazide, bumetanide, chlorthalidone, furosemide, piretanide, probenecid,

trichloromethiazide and xipamide, and two  $\beta$ -blockers: oxprenolol and propranolol), exhibiting different acid-base behaviour was studied. The compounds were tested in a Zorbax SB-C18 column under a wide range of conditions: 25–45% (v/v) acetonitrile, pH 3–7 and 20–50°C. A model considering the three factors (organic solvent content, temperature and pH) was developed from a previously reported equation, which considers the polarity contributions of solute, stationary phase and mobile phase. This allowed a comprehensive method to predict the retention of the 11 compounds, the modification of their acid-base behaviour (i.e. determination of protonation constants and shifts of the retention versus pH curves), and the selectivity changes within the ranges of the studied factors.

Modelling the retention of the 11 compounds was troublesome in more than one sense. The same experimental design should satisfy the information requirements for several solutes with different protonation behaviour. This means that in some experimental conditions a solute can be well sampled, but in others there is not enough information for a proper fitting. Moreover, the simultaneous inclusion of three factors with mutual interactions makes the application of empirical equations unsuited. In addition, the pH is particularly problematic, due to the sudden drops in retention. Consequently, the number of experimental data needed to fit the retention models could be quite larger than what expected from the number of model coefficients.

The proposed retention model including three factors (Eq. (5.13) in Chapter 5) was derived for monoprotic analytes. Polyprotic compounds apparently are out of its scope. However, in many instances, secondary protonations do not manifest in the pH chromatographic window, owing to the distance between successive protonation constants ( $\log K$ ). Indeed, some of the probe compounds were polyprotic (bumetanide, furosemide, xipamide and trichloromethiazide), and as can be concluded from the correlation plots, the simplification was valid. A second simplification in the model concerns the dependence imposed to  $\log K$  with the solvent content and temperature. Apparently, the scattering observed in the correlation plots for low retention seemed to point out the need of a more complex dependence (e.g. with additional quadratic terms). We checked, however, that this did not lead to significant improvements.

In the case of ionisable solutes, the three studied factors are interesting to govern selectivity and retention. Temperature has an influence in some instances comparable to

the organic solvent. The upper limit of the temperature range should be extended appreciably to magnify the differential effect of this factor. However, this requires special instrumentation.

The study was focused to develop and test a complex model. Thus, our design was comprehensive, and included 34 experiments (11 were replicates), which are far unpractical in routine work, when the purpose is developing new separation methods. A future aim is reducing the experimental effort as much as possible, to make the simultaneous optimisation of the three factors practical.

## **Chapter 6**

### **Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds.**

#### **Benefits of the simultaneous optimisation**

The eight-parameter mechanistic model described in Chapter 5 is demonstrated to predict the retention with enough accuracy in order to face optimisations with three experimental factors (solvent content, temperature and pH), considering their mutual interactions. Polynomial models need a larger number of parameters to get similar accuracy, the risk of overfitting is larger, and the valid experimental domain, smaller.

The optimisation strategy was applied to a complex problem, consisting of 11 ionisable compounds (nine diuretics and two  $\beta$ -blockers), with the organic solvent content, temperature and pH as experimental factors. The data from 21 experiments, arranged in a central composite design, were used to model the retention, using local models to predict the peak efficiency and asymmetry.

The probe compounds exhibited diverse acid-base strengths, and in addition, the protonation behaviour suffered shifts with changing acetonitrile content and temperature. This gave rise to multiple peak crossings. In fact, full resolution in reasonable analysis times was found only in narrow domains of the factor space. Solving problems like this with combinations of only two factors can be risky, except if the third factor is fixed to an adequate level.

The optimisation strategy, based on the peak purity as chromatographic objective function and derived concepts, was able to find the most suitable experimental conditions yielding full-resolution in reasonable analysis times. It also allowed a detailed inspection of the separation capability of the studied factors, and of the consequences of the shifts in the protonation constants originated by changes in solvent content and temperature.

The order of importance of the three studied factors and their impact on selectivity depended on the compound and the region of the experimental domain. For a given compound, the pH is the most critical factor in the neighbourhood of its acid-base transition, which covers around three pH units. The problem is magnified due to the fact that the organic solvent content and temperature affect the acid-base strength of solutes. If the sample involves several compounds with particular acid-base behaviours, the combination of the outlined effects will yield thin resolution structures. This is translated in a critical optimisation. In addition, the implementation of the predicted optimal separation will be hard.

Predicted optimal conditions corresponding to two different optimal resolution regions were verified experimentally. In spite of the difficulties associated to the use of pH as an optimisation factor, satisfactory agreement was found in both cases.

The predictions of retention were assumed as strictly accurate. This means that the existence of errors associated to the retention modelling step, and to the translation of the optimal conditions to the chromatograph, was neglected. The effect of incidental sources of error were only checked when the predicted separation was contrasted with the experimental one. A more realistic optimisation demands including these sources of error in the search of the optimal separation conditions.

## Chapter 7

### **Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of $\beta$ -blockers with a Chromolith RP-18e column**

The chromatographic performance of a Chromolith RP-18e column was comprehensively examined for a group of 10  $\beta$ -blockers, eluted with isocratic acetonitrile-water mixtures at increasing flow-rate up to 6 ml min<sup>-1</sup>. As the flow-rate increases at fixed mobile phase composition, peak distribution is maintained, but the relative peak widths increase. This reduces the resolution below satisfactory values for closely eluting compounds. With the monolithic column, flow-rate becomes, thus, an important factor to be optimised, in addition to the mobile phase composition.

Theoretically, retention factors ( $k$ ) are independent of the flow-rate, therefore the classical quadratic model relating  $\log k$  with the solvent content should allow the prediction of the retention at any combination of organic solvent content and flow-rate. In principle, the interpretive optimisation of the experimental conditions considering both mobile phase composition and flow-rate can be carried out in a similar fashion to the conventional optimisation of mobile phase composition at fixed flow-rate, using Eq. (7.1) in combination with Eq. (7.3) (see Chapter 7). Moreover, the model coefficients obtained from runs at varying mobile phase composition (i.e. at least four to assure good accuracy) and fixed flow-rate could be used to predict the retention and peak shape at any other flow-rate. It should be noted, that for this purpose, an appropriate dead time marker is needed.

The accuracy of the predictions with Eq. (7.1) for the most retained  $\beta$ -blockers were, however, not entirely satisfactory. The deviations required the addition of another term to the classical quadratic model, correlating  $\log k$  with the flow-rate (Eq. (7.6)). The calculation of the coefficients of this model needs, however, some additional runs at another flow-rate. With six experimental conditions (at three mobile phase compositions, each one at two flow-rates), all coefficients in Eq. (7.6) could be obtained with enough accuracy. Another possibility to develop the model is working at a relatively low flow-rate (at 1 ml min<sup>-1</sup> using the data obtained at three or four mobile phase compositions), and carry out additional runs with the optimal mobile phase at another flow-rate.

Peak shape and resolution changes can be predicted by taking advantage of the approximated linear relationships between peak half-widths and retention times, which offer similar coefficients for peaks eluting at different organic solvent contents and flow-rates in the working ranges. The accuracy of the predictions in critical conditions was experimentally verified to be satisfactory.

The flow-rate level is constraint by instrumental limitations (i.e. pump and detector), and the deterioration of the efficiencies and, consequently, the resolution of the most critical peaks. The interpretive strategy described in this work, whose reliability has been demonstrated, will help the analyst to select the best conditions with monolithic columns, with minimal experimental effort. In any case, it will offer a comprehensive description of the column performance for the analysed sample.

## Chapter 8

### **Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of $\beta$ -blockers**

Numerous reports have been published, where the performance of Chromolith columns are compared with one or more microparticulate columns of the same type, but different manufacturer. These comparisons are made usually at only one or at a few mobile phase compositions. In some cases, some similarities in selectivity have been observed among the columns. In other cases, the columns seemed to behave different. However, the similarities may depend on the mobile phase composition. For this reason, in this work, the comparisons between columns were extended to a range of compositions. The quadratic model that correlates  $\log k$  versus organic solvent content facilitated the study. This model can be fitted using the retention data associated to only 3–4 mobile phase compositions, and allows accurate predictions in a wide range of compositions.

There is a wide range of silica-based packed columns available in the market. Leaving aside the possibility of working at high flow-rate, previous work showed the Chromolith column as only one column more, with no more difference between the retention patterns with regard to a packed column, than between two packed columns of

different brands. In this work, we compared the Chromolith column with three microparticulate RPLC columns manufactured with different types of silica: Spherisorb (type-A silica), Kromasil (type B) and XTerra (type B combined with methylsilane).

We were interested in examining the performance of the Chromolith column (Chromolith RP-18e) for a specific group of compounds (several  $\beta$ -blockers), and made a comprehensive comparison, including all the relevant chromatographic features: analysis time, selectivity, peak shape (efficiency and asymmetry), method transference between columns, and resolution, in a wide range of mobile phase compositions.

The Chromolith column behaved similarly to the XTerra column in terms of analysis time and selectivity, in a wide range of mobile phase compositions, although the peak shape was improved with the XTerra column (at 1 ml/min). Although in a lesser extent, the selectivities for the Chromolith and Kromasil columns were similar, but with longer analysis times for the latter. When 0.1% triethylamine (TEA) was added to both Chromolith and Spherisorb columns, the peak shapes and selectivities, which differed significantly without TEA, became similar. This may indicate that with TEA, the same blocking degree of silanol groups is achieved for both columns.

The study showed that the Chromolith column has favourable features with regard to the other columns in the analysis of  $\beta$ -blockers, which are typical basic drugs. This conclusion contrasts with previous comments on the inadequacy of Chromoliths in the separation of basic compounds.

The great advantage of Chromoliths of allowing high flow-rates with low backpressure should not be overlooked. However, the commercialisation of silica-based monolithic columns of different brands as is the case of the hundreds of packed columns in the market is needed to encourage the use of monolithic columns.



## Chapter 9

### Estimation of $\log P_{o/w}$ using a new chromatographic approach

The proposed approach is based on a previously reported model that relates the retention in reversed-phase liquid chromatography with solute ( $p$ ), mobile phase ( $P_m^N$ ) and stationary phase ( $P_s^N$ ) polarity parameters (Eq. (9.10) in Chapter 9), where  $P_m^N$  is calculated through expressions that depend only on the organic solvent fraction in the mobile phase, which are available for the most usual organic modifiers (methanol and acetonitrile). The model parameters  $(\log k)_0$  and  $P_s^N$  that characterize the column were determined from the retention data of a selected set of 12 compounds.

The  $p$  descriptors are characteristic of each solute, and can be easily derived from the retention data in a properly characterised system (with known  $(\log k)_0$  and  $P_s^N$ ). The  $p$  descriptors depend on the chromatographic system, but are linearly related to those in another system. Therefore, they can be easily transferred between systems.

On the other hand, a previous Quantitative Structure-Property Relationship (QSPR) study revealed that the  $p$  descriptors in a Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile as organic modifier (taken here as the reference chromatographic system) depended, mainly, on the compound polarity expressed as the  $n$ -octanol/water partition coefficient ( $\log P_{o/w}$ ), and four additional structural descriptors, which can be easily calculated through the CODESSA software from the chemical structures of solutes (Table 9.1).

We determined the  $p$  descriptors for a wide set of structurally different organic compounds in several chromatographic systems (Luna C18 and Chromolith Performance RP-18, and acetonitrile and methanol as modifiers) and transferred the data to the reference one. From the  $p$  values in the reference system and the CODESSA structural parameters, the  $\log P_{o/w}$  values of the compounds were calculated. These were checked to agree with those determined using classical experimental techniques. The method demonstrated to be suitable for compounds in a wide  $\log P_{o/w}$  range (from 0 to 6.5).



## Chapter 7

### **Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate in the separation of $\beta$ -blockers with a Chromolith RP-18e column**

#### **Summary**

The chromatographic performance of a Chromolith RP-18e column was comprehensively examined for a group of  $\beta$ -blockers, eluted with isocratic acetonitrile-water mixtures at increasing flow-rate up to  $6 \text{ ml min}^{-1}$ . As the flow-rate increases at fixed mobile phase composition, peak distribution is maintained, but the relative peak widths increase. This reduces the resolution below satisfactory values for closely eluting compounds. With the monolithic column, flow rate becomes thus an important factor to be optimised, in addition to the mobile phase composition. Since, theoretically, retention factors ( $k$ ) are independent of the flow-rate, the classical quadratic model relating  $\log k$  with the solvent content allow the prediction of the retention at any combination of organic solvent content and flow-rate. The small deviations found for the most retained compounds were corrected by including, in the quadratic model, an additional term correlating linearly  $\log k$  with the flow-rate. Peak shape and resolution changes were predicted by taking advantage of the approximated linear relationships between peak half widths and retention times, which offered similar coefficients for peaks eluting at different organic solvent contents and flow-rates in the working ranges. The accuracy of the predictions in critical conditions was experimentally verified to be satisfactory.

## 1. Introduction

In recent years, silica-based monolithic columns have attracted great attention for fast chromatographic separations. These columns are made of a single piece or block of porous and permeable material (i.e. a silica rod), which can be percolated by the mobile phase, and exhibit a large surface area that allows significant retention of low molecular weight compounds [1–6]. Silica based microparticulate-packed columns have been the most popular for conventional reversed-phase liquid chromatographic (RPLC) applications during decades. This explains the interest in developing monoliths based on this material. However, silica based monolithic columns are notoriously difficult to prepare. Very few successes (protected by strong patents [7–9]) have been described of the many attempts to develop useful silica monoliths for chromatographic applications. The successful preparation of silica based rod columns was reported by the Nakanishi's research group in 1991–1992 [10,11]. However, only in 1996 they described a uniformed highly porous silica monolith with a bimodal pore structure of macropores (or throughpores) and mesopores, suitable for chromatography [12]. A cooperative study between this group and the researchers at Merck KGaA (Darmstadt, Germany) led to the release in 2000 of the first commercially available column.

Each monolith is manufactured individually via a sol-gel process that requires a series of steps. The straight silica rod is first prepared in a mould by hydrolytic polymerisation of highly purified metal-free tetramethoxysilane in aqueous acetic acid, in the presence of a water-soluble polymer (polyethylene glycol) as porogen [13]. After aging, the silica rod is subjected to a controlled pore redistribution process using aqueous ammonia at high temperature, followed by strengthening of the pore network by thermal treatment.

Silica-based monolithic columns cannot be prepared *in situ* (in contrast to polymeric monolithic columns), because of the significant shrinkage of the rod in the ageing and drying steps (e.g. 4.6 mm i.d. rods are obtained from 6 mm i.d. moulds). Also, straight long columns cannot be obtained, limiting the maximal column length to about 15 cm. The monolithic silica rod with a diameter useful for conventional RPLC should be removed from the mould, and encapsulated into a solvent- and pressure-resistant polymer tube to which the column end fittings can be attached for use in high-performance liquid chromatographic (HPLC) systems. Poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) [14] and poly(ether

ether ketone) (PEEK) have been proposed as suitable materials for the tubing, but the proprietary technology developed by Merck employs PEEK [2]. This provides a tight seal and forces the mobile phase to percolate through the monolith [15]. Encased within a PEEK tube, the silica rod is provided with the bonded chemistry for RPLC separations, through an in situ derivatisation (e.g. with octadecyldimethyl(*N,N*-diethylamino)silane for C18 columns), followed by silylation (endcapping) with hexamethyldisilazane.

Silica-based columns were first marketed by Merck under the trade name Chromolith [1]. The following analytical columns are today available: Chromolith Flash RP-18e (25 mm long), Chromolith SpeedROD RP-18e (50 mm) and Chromolith Performance RP-18e, RP-8 and Si (100 mm), together with the guard columns Chromolith RP-18e (5 and 10 mm), all of them with an internal diameter of 4.6 mm. A capillary column, Chromolith CapRod™ RP-18e (150 mm long, 0.1 mm i.d.), is also available from Merck. Later, Phenomenex (Torrance, CA, USA) began to commercialise the Onyx columns (Silica, C8 and C18, 100 mm, 2 and 3 i.d.) licensed from Merck KGaA. All these columns have stimulated the development of analytical procedures [15].

Chromoliths exhibit macropores with a size of around 2.2  $\mu\text{m}$  and mesopores of about 13 nm [15,16]. The macropores allow a high permeability (i.e. low hydraulic resistance), hence the head pressure at which the mobile phase must be pumped into the column to maintain the desired flow-rate is reduced. This makes these columns suitable for fast separations, or for the injection of high viscosity samples. Meanwhile, the mesopores provide the surface area for stationary phase coverage and chromatographic interactions. The macropores and their connectivity, together with the mesopore structure, control the mass transfer kinetics and the column efficiency. The solute reaches the pores by convection and not by diffusion [17]. At low flow-rate, Chromoliths have efficiencies that are similar to those of the classical RPLC columns packed with 3–5  $\mu\text{m}$  diameter particles, but in contrast to these columns, they maintain high efficiency when operated at high flow-rates [3,12,16,18].

Chromoliths involve several concerns or limitations:

- (i) Since their manufacturing process includes multiple steps, their batch-to-batch (or even, column-to-column) reproducibility might be poor. It has been demonstrated, however, that it is better or matches the values obtained with microparticulate packed columns [15,19,20].

- (ii) Because the total porosity of the monolithic silica matrix is greater than 80%, users can perform chromatography with a much lower backpressure with respect to conventional microparticulate columns, which have total porosities of approximately 65%. In theory, silica-based monolithic columns can be operated at high flow-rates of up to 9–10 ml min<sup>-1</sup>, which imply a significant reduction in the analysis time. However, flow-rates in the range 1–5 ml min<sup>-1</sup> are commonly used for several reasons. First, manufacturers recommend that the routine operating pressure should be below 200–250 bar to extend the lifetime of the pump and injection system. Also, base-line increases have been reported at high flow-rates with some detectors [17]. Finally, many simple applications do not require higher flow-rates because there is no need of extremely short analysis times [21].
- (iii) Column ageing is a constant concern in the analytical laboratories. Accordingly, some authors have checked the effects of the exposure of Chromoliths to frequent mobile phase changes in pH (in the range 3.5 to 7), temperature (up to 45°C), and flow-rate (up to 9 ml min<sup>-1</sup>). It was found that the retention factors and resolution remained fairly constant at least after 300 injections, or 22,000 column volumes of use [21].
- (iv) The maximal operating temperature for Chromoliths recommended by the manufacturer is 45°C. The restriction is likely due to the risk of deformation of the organic polymer cladding.
- (v) Fast elution times at high flow-rates require a detector and data acquisition system with a high sampling rate to monitor peaks properly. For quantitation purposes, particularly for early eluting peaks at high flow-rates (8–9 ml min<sup>-1</sup>), sampling periods of 100 ms may not be short enough to reconstruct the peak profiles.
- (vi) The existing risk of damage in microparticulate columns by movements inside the column is eliminated in Chromoliths, due to their nature. Also, the risk of clogging is expected to be no larger than for microparticulate packed columns [5]. Chromoliths seem to be more resistant to fouling by complex, real samples and of requiring a lesser degree of sample clean up. This is particularly useful for samples of biological or clinical origin.

- (vii) Finally, Chromoliths are silica packings, so they cannot be used under too high or low pH.

In spite of the expectations on Chromoliths, their practical use has not been as wide as expected. The reason could be that more comprehensive information is needed to understand their performance in a wide range of chromatographic conditions, assisted by consistent interpretation of the data. This can be achieved through modelling studies of retention and peak shape, which were extensively reviewed in Ref. [22]. In this work, we show the application of this standpoint to examine the separation features of a Chromolith Performance RP-18e column under isocratic conditions at varying mobile phase composition and flow-rate, using several basic drugs ( $\beta$ -blockers) as probe compounds.

## **2. Experimental**

### **2.1. Reagents**

The chromatographic behaviour of the following  $\beta$ -blockers was examined: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid, Spain), atenolol, pindolol, propranolol, timolol (Sigma, St. Louis, MO, USA), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona, Spain), esmolol (Du Pont-De Nemours, Le Grand Saconnex, Switzerland), labetalol (Glaxo, Tres Cantos, Madrid), metoprolol, and oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona). Acebutolol, carteolol, labetalol, metoprolol and oxprenolol were kindly donated by the pharmaceutical laboratories. The concentration of the injected solutions, which remained stable during at least two months at 4°C, was ca. 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Uracil (Acros Organics, Geel, Belgium) was used as dead time marker.

The mobile phases were prepared with acetonitrile (Scharlab, Barcelona, Spain). The pH was buffered at 3.0 with 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and addition of HCl (Panreac, Barcelona). Nanopure water (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA) was used throughout. The drug solutions and mobile phases were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon membranes (Osmonics, Herental, Belgium), with a diameter of 47 mm (Magna) and 17 mm (Cameo), respectively.

## 2.2. Apparatus

The HPLC system was equipped with an isocratic pump (Agilent 1200, Waldbronn, Germany), an autosampler, a temperature controller set at 25°C, and a UV-visible detector (Series 1100) set at 225 nm, except for timolol which was monitored at 300 nm. The sampling period was 400 ms. A Chromolith Performance RP-18e analytical column (100 × 4.6 mm i.d.), preceded by a Chromolith guard column RP-18e (5 × 4.6 mm i.d.), both from Merck (Darmstadt, Germany), was used. Triplicate injections were made, with an injection volume of 20 µl. Data acquisition was carried out with an HPChemStation (Agilent), and mathematical treatment was performed in MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, USA) and Microsoft Visual Basic 6.0 SP6 (Seattle, WA, USA).

## 3. Results and discussion

Monolithic columns allow different flow-rates, beyond those suitable for conventional microparticulate packed columns. This is possible due to the lower backpressures and higher efficiencies at high flow-rates (i.e. flatter van Deemter curves) [3,12,16,18]. Flow-rate becomes, therefore, an important factor to be considered with these columns in addition to the mobile phase composition, in order to achieve good resolution at sufficiently low analysis times.

Method development on a monolithic column is often carried out at flow-rates similar to those usual in conventional microparticulate packed columns (e.g. 1 ml min<sup>-1</sup>). If the separation is succeeded at this flow-rate, the method is speeded up at the optimal mobile phase composition by increasing the flow-rate to the operational limit or to a value where enough resolution is still achieved. This is usually made by trial-and-error. However, at increasing flow rate, peaks are relatively wider and the resolution can soon deteriorate in chromatograms containing critical peak pairs. In this case, the use of computer-assisted interpretive approaches based on retention and peak shape models can be advantageous to optimise the separation. These approaches allow also a comprehensive exploration of the chromatographic performance upon changes in the experimental factors (e.g. organic solvent content and flow rate) [22,23].



The application of a computer-assisted methodology to the optimisation of resolution in Chromolith columns is shown below. For this purpose, the separation of a set of ten  $\beta$ -blockers in a Chromolith Performance RP-18e column, eluted with acetonitrile water mixtures at several flow-rates was considered, but the study can be extended to any other compound set. Global models able to predict the retention and peak shape at any solvent content and flow-rate were used, giving rise to realistic predictions of the resolution.

### **3.1. Description of the chromatographic behaviour**

In order to explore the factor space in detail, an experimental design consisting of 20 mobile phases at several acetonitrile and flow-rate levels was carried out. The acetonitrile content varied in the range 10–25% (v/v), and the flow-rate was increased in the range 1–5 ml min<sup>-1</sup> (in steps of 1 ml min<sup>-1</sup>) for 10, 15 and 20% acetonitrile (5×3 mobile phases), and in the range 0.5–2.5 ml min<sup>-1</sup> for 25% acetonitrile (5×1 mobile phases).

Some additional experiments were carried out at 6 ml min<sup>-1</sup>. This flow-rate gave the maximal allowed backpressure recommended by the pump manufacturer, and not always could be reached. The system control allowed 400 bars at flow-rates between 0.5 and 5 ml min<sup>-1</sup> (the backpressure was observed to increase almost linearly in this flow-rate range), whereas the backpressure top limit decreased to 200 bars at flow-rates > 5 ml min<sup>-1</sup>. On the other hand, the resolution deteriorated significantly for  $\beta$ -blockers eluting below 1 min for flow-rates above 6 ml min<sup>-1</sup>.

The errors associated to the preparation and changes with time of the organic solvent content were minimised by using the same stock mobile phase to carry out the measurements at several flow-rates, starting from 0.5 up to 5 ml min<sup>-1</sup>. Each series (i.e. each solvent content level) required one to three days of work, since triplicate measurements were made. In order to avoid the evaporation of acetonitrile in the stock mobile phases, the reservoir was carefully sealed with Parafilm.

Two approaches were used to determine the dead time: detection of the first perturbation in the chromatograms and of the peak of a marker (uracil). In both cases, the dead time values were checked to be independent of the mobile phase composition in the working range, with relative standard deviations below 2%.

In order to assess the repeatability of the experimental retention times, ten replicated injections of a solution containing uracil and three  $\beta$ -blockers (pindolol, esmolol and labetalol) were carried out, using 20% acetonitrile as eluent and different flow-rates. The measurements were made in an 8-hour period. The mean retention times and relative standard deviations (RSD) are given in Table 1. RSD values were usually below 0.15%, except for the measurements at 4 ml min<sup>-1</sup>. At this flow-rate, two runs were discarded, since the corresponding retention times were abnormally high, which indicated occasional reductions in the flow-rate up to 5%. From Table 1, it can be observed that RSD values increase with retention time, while no clear pattern can be deduced when the flow-rate is increased.

### 3.2. Prediction of the retention

#### 3.2.1. Retention models at fixed flow-rate

The retention behaviour in RPLC at a given flow-rate can be modelled accurately by establishing a quadratic relationship between the logarithm of the retention factor,  $k$ , and the volume fraction (v/v) of organic solvent in the aqueous-organic mobile phase,  $\varphi$  [22–25]:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (1)$$

where  $c_0$ ,  $c_1$ , and  $c_{11}$  are regression coefficients with characteristic values for a given solute and column/solvent system, and  $k$  is defined as:

$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

$t_R$  and  $t_0$  being the retention time and dead time, respectively. In previous work, we have found accuracies of ca. 1–3% in the description of the retention with Eq. (1) for compounds of different nature, eluted with acetonitrile-water mobile phases at 1 ml min<sup>-1</sup> using conventional microparticulate columns [26,27].

**Table 1.** Mean values and relative standard deviations (RSD) for ten-fold replicated injections of several compounds, eluted with 20% acetonitrile at different flow-rates.

Compound	1 ml min <sup>-1</sup>		2 ml min <sup>-1</sup>		3 ml min <sup>-1</sup>		4 ml min <sup>-1</sup>		5 ml min <sup>-1</sup>	
	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	RSD (%)
Uracil	1.58	0.013	0.79	0.02	0.53	0.04	0.40	0.9	0.32	0.09
Pindolol	2.53	0.04	1.27	0.02	0.85	0.05	0.65	0.9	0.52	0.10
Esmolol	5.18	0.10	2.61	0.05	1.75	0.06	1.34	1.1	1.07	0.08
Labetalol	9.27	0.15	4.68	0.09	3.16	0.08	2.42	1.1	1.94	0.12

The calculation of  $k$  (Eq. (2)) implies moving the origin of retention times to the time of an unretained compound, and correction of the flow effects through division by the dead time. The retention factor normalises the retention and allows the comparison of different columns, or the same column at different flow-rates [28], which is the case of study in this work. The retention factor should not depend, therefore, on the flow-rate.

As commented in Section 3.1, we developed an experimental design where the effect of the solvent content on retention was examined at different flow-rates. With these data, we first obtained particular models (Eq. (1)) at each experimental flow-rate level. Prediction of retention times at any solvent content was made by combining Eq. (1) and:

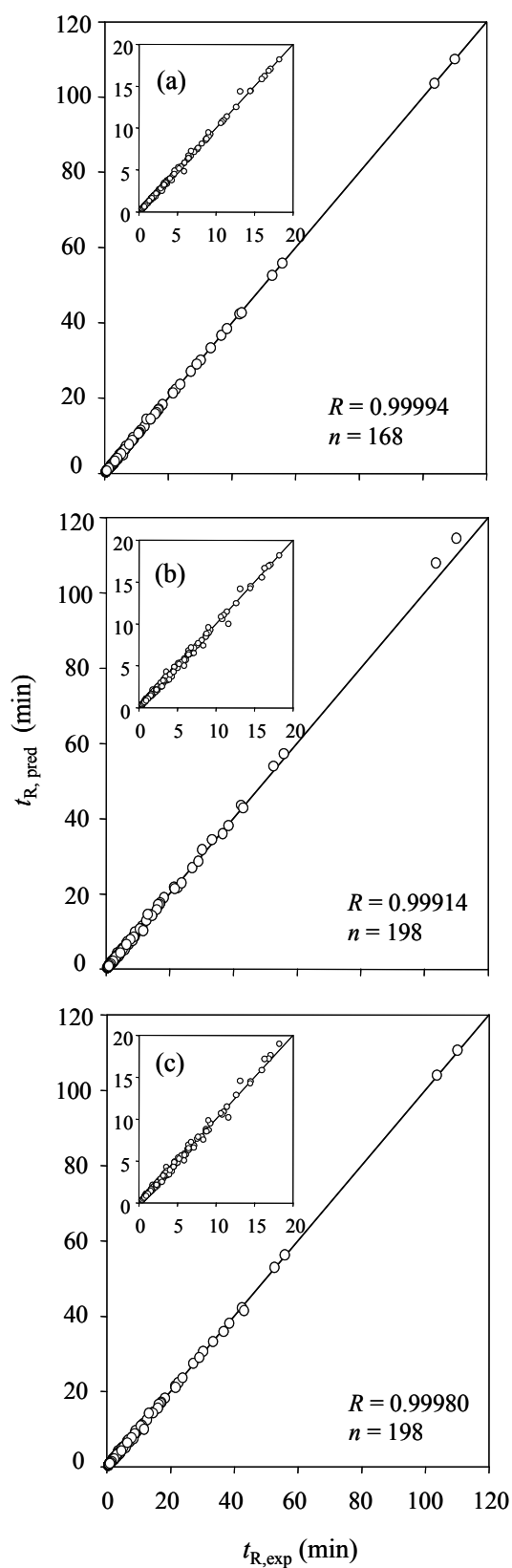
$$t_R = t_0 (1 + k) \quad (3)$$

obtained from Eq. (2), where the experimental dead time at each flow-rate was used.

Fig. 1a depicts the accuracy of the predictions by comparing the predicted and experimental retention times, using uracil as dead time marker. This is the target accuracy to be achieved with a global model, considering both solvent content and flow-rate.

As observed, the predictions were highly satisfactory. However, the model coefficients (Table 2) showed a significant variability with the flow-rate. In a recent work [29], deviations in retention were found with a Chromolith column at increasing flow-rate (i.e. these were not halved as the flow-rate was doubled). The authors interpreted this behaviour by indicating that their HPLC instrument was produced in the “premonolithic era”, and was not mean to operate at flow-rates above  $2.0 \text{ ml min}^{-1}$ , because the available conventional HPLC columns did not allow flow-rates higher than that.

Fig. 2 shows the chromatograms obtained at different flow-rates for the  $\beta$ -blockers that were resolved at 20% acetonitrile in the flow-rate range  $1\text{--}5 \text{ ml min}^{-1}$  (timolol, which overlapped critically with acebutolol and metoprolol was not included). The timescale of the chromatograms was adjusted to an equivalent size to facilitate the comparison. Note that for this purpose, the maximum of the first and last eluting peaks were matched in all chromatograms. Indeed, theoretically, the maxima of all peaks should match.



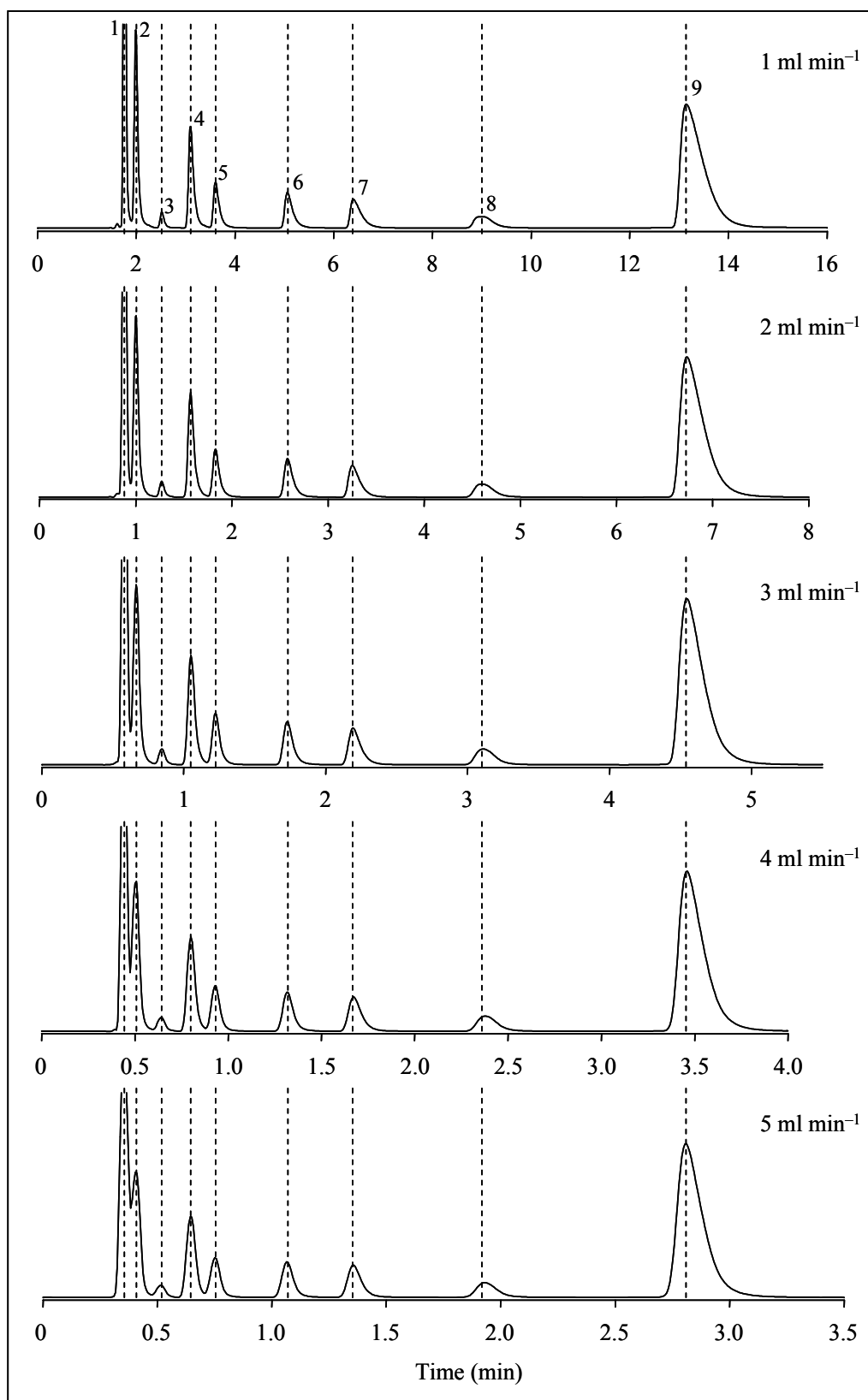
**Figure 1.** Accuracy in the predictions of the retention for the ten  $\beta$ -blockers. Retention models: (a) Eq. (1) fitted at fixed flow-rate, (b) Eq. (1) fitted considering different flow-rates, (c) Eq. (6). The inner plots magnify the regions of low retention times.

**Table 2.** Regressed coefficients for the individual quadratic models (Eq. (1)) at fixed flow-rate.

Compound	1 ml min <sup>-1</sup>			2 ml min <sup>-1</sup>			3 ml min <sup>-1</sup>		
	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>
Atenolol	0.87	-15.2	30.9	0.79	-13.9	26.9	0.64	-11.2	16.85
Carteolol	1.52	-12.3	9.90	1.48	-11.6	7.25	1.17	-6.64	-10.4
Pindolol	1.03	-5.11	-4.80	1.02	-4.89	-5.47	0.87	-2.32	-15.4
Timolol	2.84	-20.0	28.4	2.88	-20.1	28.5	1.91	-8.89	-3.17
Metoprolol	1.80	-7.93	-1.82	1.80	-7.78	-2.24	1.65	-5.28	-11.8
Acebutolol	2.13	-11.7	5.45	2.22	-12.8	9.09	2.12	-11.0	2.12
Esmolol	2.23	-9.21	-0.19	2.19	-8.65	-1.86	2.07	-6.55	-9.98
Oxprenolol	2.28	-8.48	-1.72	2.14	-6.43	-8.04	1.98	-3.71	-18.4
Labetalol	2.91	-10.99	-0.35	2.81	-9.48	-5.01	2.78	-8.39	-10.2
Propranolol	2.42	-4.15	-17.1	2.48	-4.86	-14.7	2.42	-3.57	-20.6

**Table 2** (continued)

Compound	4 ml min <sup>-1</sup>			5 ml min <sup>-1</sup>			Mean values (1–5 ml min <sup>-1</sup> )		
	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>	<i>c</i> <sub>0</sub>	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>11</sub>
Atenolol	0.67	-11.4	16.7	0.37	-6.64	-0.48	0.67 ± 0.19	-11.7 ± 3.3	18 ± 12
Carteolol	1.50	-11.3	5.76	1.50	-11.2	5.41	1.43 ± 0.14	-10.6 ± 2.3	3.6 ± 8.0
Pindolol	0.92	-2.94	-13.6	1.01	-4.25	-8.81	0.97 ± 0.07	-3.9 ± 1.2	-9.6 ± 4.8
Timolol	1.90	-8.80	-3.14	1.86	-8.58	-3.06	2.27 ± 0.53	-13.3 ± 6.2	9.5 ± 17.3
Metoprolol	1.72	-6.08	-9.28	1.82	-7.62	-3.82	1.76 ± 0.07	-6.9 ± 1.2	-5.8 ± 4.5
Acebutolol	2.21	-12.1	5.52	2.27	-12.9	8.26	2.19 ± 0.06	-12.1 ± 0.8	6.1 ± 2.7
Esmolol	2.15	-7.62	-6.55	2.24	-8.75	-2.73	2.17 ± 0.07	-8.2 ± 1.1	-4.2 ± 4.0
Oxprenolol	2.02	-4.27	-16.4	2.20	-6.78	-8.14	2.12 ± 0.12	-5.9 ± 2.0	-10.5 ± 6.8
Labetalol	2.74	-7.96	-11.1	2.89	-10.0	-4.51	2.82 ± 0.07	-9.4 ± 1.2	-6.2 ± 4.4
Propranolol	2.53	-5.21	-15.0	2.50	-4.62	-17.0	2.47 ± 0.05	-4.48 ± 0.64	-16.9 ± 2.3



**Figure 2.** Experimental chromatograms at 20% acetonitrile and varying flow-rate. Compounds: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) pindolol, (4) acebutolol, (5) metoprolol, (6) esmolol, (7) oxprenolol, (8) labetalol, and (9) propranolol.



Fig. 3a plots the retention times of several  $\beta$ -blockers versus the reversed flow-rate ( $1/F$ ). The values are well aligned following a linear behaviour (regression coefficients were  $>0.9999$ ):

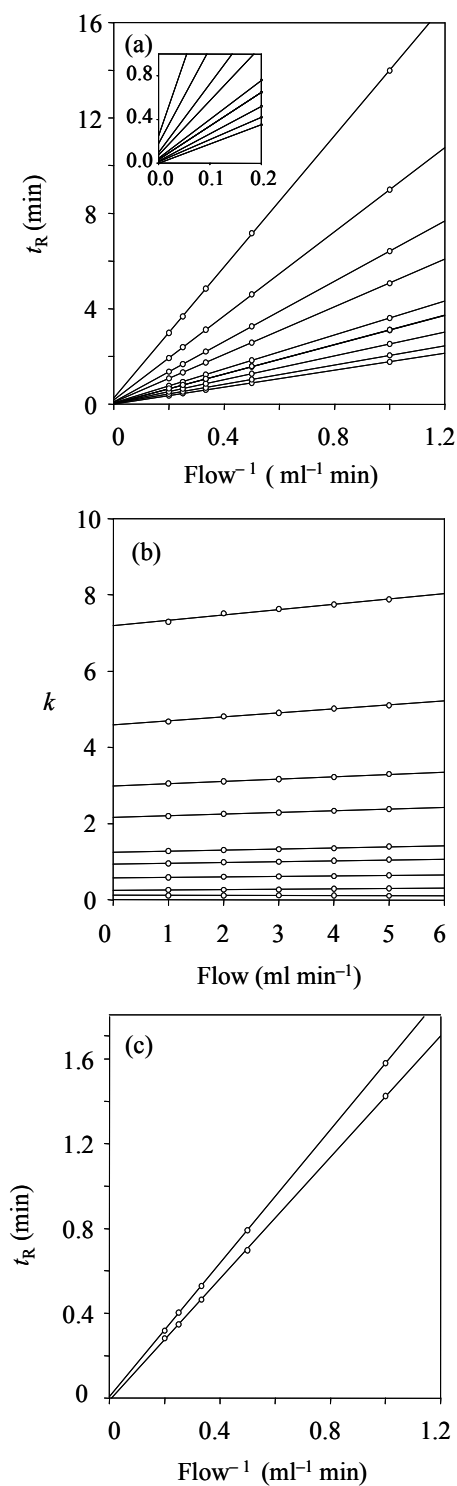
$$t_R = c_0 + \frac{c_1}{F} \quad (4)$$

which ideally should exhibit null intercept ( $c_0$ ), and the slope ( $c_1$ ) coincide with the retention time at  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . However, the fitted straight-lines for the most retained compounds (i.e. esmolol, oxprenolol, labetalol and propranolol) exhibited significant intercepts, which correlated with the compound polarity. The same behaviour was found at other mobile phase compositions. Thus, for example, for propranolol eluting at 10 and 20% acetonitrile:  $c_0 = 2.15$  and  $0.25$ , and  $c_1 = 107.8$ , and  $12.88$ , whereas the peak times at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  were  $110.0$  and  $13.12 \text{ min}$ , respectively. For pindolol:  $c_0 = 0.079$  and  $0.017$ , and  $c_1 = 6.16$  and  $2.50$ , whereas the peak times at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  were  $6.24$  and  $2.52 \text{ min}$ , respectively. The positive intercept can be the reason for the retention times not to halve exactly when the flow-rates are doubled. The consequence is that the retention factors for the most retained compounds depend on the flow-rate (i.e.  $k$  versus flow-rate lines are sloped, instead of being horizontal) (Fig. 3b).

### 3.2.2. Global model considering solvent content and flow-rate

Eq. (1) (in combination with Eq. (3)) can also be used as a global model to describe the retention behaviour of the  $\beta$ -blockers in the whole experimental domain. The coefficients in Eq. (1) can be obtained from runs carried out at fixed flow-rate, but also from runs at different organic solvent content and flow-rate. Accordingly, we processed altogether the data in the whole experimental domain (Table 3).

As commented, in theory, the retention factors should be independent of flow-rate. This means that once these are predicted at a given mobile phase composition (and flow-rate) according to Eq. (1), Eq. (3) will offer the retention time at any other flow-rate, by only substituting the value of the corresponding dead time, which is correlated with the reversed flow-rate.



**Figure 3.** Dependence on the flow-rate of: (a) retention times for the set of  $\beta$ -blockers eluted with 20% acetonitrile, (b) corresponding retention factors, (c) retention time of uracil (top line) and time of the first perturbation (bottom line). In (a,b), from bottom to top: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) pindolol, (4) acebutolol, (5) metoprolol, (6) esmolol, (7) oxprenolol, (8) labetalol, and (9) propranolol. The inner plot in (a) magnifies the region of low retention times.

**Table 3.** Regressed coefficients for global retention models fitted using simultaneously the data in the whole experimental domain (varying solvent content and flow-rate).

Compound	Eq. (1)			Eq. (6)		
	$c_0$	$c_1$	$c_{11}$	$c_0$	$c_1$	$c_2$
Atenolol	1.60	-26.5	73.4	1.59	-27.0	0.0119
Carteolol	1.51	-11.8	8.34	1.49	-12.0	0.0105
Pindolol	1.05	-5.22	-4.64	1.04	-5.36	0.0066
Timolol	1.85	-8.91	-0.96	1.82	-8.81	0.0085
Metoprolol	1.82	-7.93	-1.98	1.80	-8.07	0.0078
Acebutolol	2.24	-12.9	9.06	2.22	-13.0	0.0102
Esmolol	2.23	-9.08	-0.71	2.22	-9.21	0.0080
Oxprenolol	2.19	-7.00	-6.40	2.17	-7.12	0.0070
Labetalol	2.88	-10.2	-2.82	2.86	-10.3	0.0079
Propranolol	2.53	-5.51	-12.9	2.52	-5.58	0.0072

Fig. 3c plots the times of the first perturbation (bottom line) and the peak of uracil (top line), which were used to estimate the dead time, versus the reversed flow-rate. The coefficients in Eq. (4) for the first perturbation and uracil were:  $c_0 = -0.013$  and  $-0.004$ , and  $c_1 = 1.423$ , and  $1.576$ , whereas the times at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  were:  $1.410$  and  $1.580$ , respectively. These results show that the dead time is more properly measured by uracil, since it exhibits almost null intercept. Indeed, we checked that the predictions were poorer using the time of the first perturbation, and consequently, the peak of uracil was selected as dead time marker. Fig. 1b shows the accuracy of Eq. (1) as global model, which is slightly poorer compared to the individual models at fixed flow-rate, especially for the most retained compounds.

In the literature, several authors have reported models to describe the retention in RPLC with microparticulate packed columns, involving experimental designs that include the organic solvent content and flow-rate as factors, which adopt the following general expression:

$$y = c_0 + c_1 \varphi + c_2 F + c_{12} \varphi F + c_{11} \varphi^2 + c_{22} F^2 \quad (5)$$

where the response ( $y$ ) is the retention time [30,31], or the retention factor ( $\log k$ ) [32,33].

Based on these models, we considered the flow effect in the global model as follows:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 + c^2 F \quad (6)$$

Table 3 shows the regression coefficients in Eq. (6) for the ten  $\beta$ -blockers. Fig. 1c depicts the accuracy of the retention time predictions using this model, which was similar to that obtained with the individual models at each flow-rate (Fig. 1a).

### 3.3. Prediction of peak shape

A common behaviour of RPLC columns, including Chromoliths, is the reduction in efficiencies at increasing flow-rate (i.e. increase in relative chromatographic peak widths). This should be considered for the realistic prediction of chromatograms and in the calculation of resolution at any experimental condition. It has been extensively commented that ideal symmetric peaks are rarely found in RPLC (if ever), due to various intra- and extra-column sources of asymmetry [34]. This suggests that the elution profiles cannot be properly described using the simple Gaussian model. In addition, incidental

variations in peak profile with mobile phase composition and other factors should be considered to predict realistic chromatograms.

In this work, chromatographic efficiencies for the ten  $\beta$ -blockers, expressed as theoretical plates ( $N$ ), were estimated according to the equation of Foley and Dorsey [34]:

$$N = \frac{41.7 \left( \frac{t_R}{A+B} \right)^2}{1.25 + \frac{B}{A}} \quad (7)$$

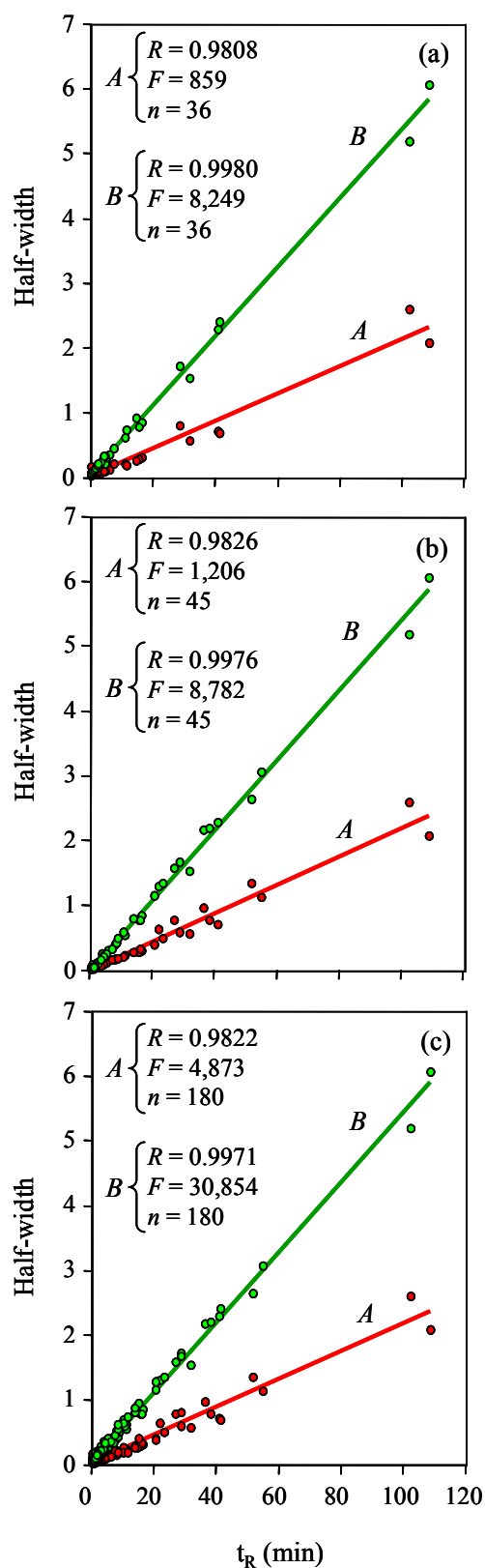
where  $A$  and  $B$  are the left and right half-widths at 10% peak height. Eq. (7) includes the peak asymmetry, measured as the tailing-to-fronting half-width ratio ( $B/A$ ).

Fig. 4 shows that the relationships between the peak half-widths ( $A$  and  $B$ ) and the retention time for the  $\beta$ -blockers, which are in fact quadratic, can be approximated to straight lines in the working experimental range.

$$A = c_{0,A} + c_{1,A} t_R \quad (8)$$

$$B = c_{0,B} + c_{1,B} t_R \quad (9)$$

The peak half-widths for  $\beta$ -blockers at fixed flow-rate and varying mobile phase composition are shown in Fig. 4a (for 1 ml min<sup>-1</sup>, but similar results were obtained at other flow-rates), and the peak half-widths at fixed mobile phase composition and varying flow-rate are shown in Fig. 4b (for 10% acetonitrile, but similar results were obtained at other mobile phase compositions). These simple linear relationships have been used with success for optimisation purposes to predict the peak shape (efficiency and asymmetry) at fixed flow-rate in microparticulate columns [35]. We extend here the use of these equations to Chromoliths, when the flow-rate is also optimised.



**Figure 4.** Dependence of the left (*A*) and right (*B*) half-widths with the retention time for the ten  $\beta$ -blockers. The chromatographic data correspond to: (a) varying acetonitrile content in the range 10–25% and 1 ml min<sup>-1</sup>, (b) 10% acetonitrile and varying flow-rate in the range 1–5 ml min<sup>-1</sup>, (c) the whole experimental design in the ranges 10–25% acetonitrile and 0.5–5 ml min<sup>-1</sup>.

The intercepts and slopes for the fitted straight-lines (Eqs. (8) and (9)) for the ten  $\beta$ -blockers at fixed flow-rate are given in Table 4. The mean parameters obtained by averaging the values at different flow-rates were:  $c_{0,A} = 0.0213 \pm 0.0022$ ,  $c_{1,A} = 0.0227 \pm 0.0010$ , and  $c_{0,B} = 0.031 \pm 0.019$ ,  $c_{1,B} = 0.0562 \pm 0.0024$ . The coefficients obtained using the whole set of data in the experimental design (Fig. 4c) were:  $c_{0,A} = 0.029$ ,  $c_{1,A} = 0.0215$ , and  $c_{0,B} = 0.045$ ,  $c_{1,B} = 0.0540$ . The measurement of peak half-widths is hold to a certain level of uncertainty, especially for the most apolar compounds (e.g. labetalol and propranolol in the  $\beta$ -blockers set), which showed highly tailing peaks in some conditions. This may be the reason of the scattering in the plots (Fig. 4).

**Table 4.** Regressed coefficients for the relationships between half-widths and retention times (Eqs. (8) and (9)) for the ten  $\beta$ -blockers eluted at several solvent contents.

Flow-rate (ml min <sup>-1</sup> )	$c_{0,A}$	$c_{1,A}$	$c_{0,B}$	$c_{1,B}$
1	0.0251	0.0211	0.0655	0.0532
2	0.0211	0.0223	0.0391	0.0533
3	0.0184	0.0225	0.0186	0.0584
4	0.0201	0.0236	0.017	0.0586
5	0.0218	0.0239	0.0161	0.0576

The slopes of the relationships between half-widths and retention times offer information about the peak shape in a given column. The larger slope for *B* indicates the tailing character of the peaks. The results show that the particular values of peak efficiency (Eq. (7)) and asymmetry for each compound in a given experimental condition (organic solvent content and flow-rate) can be predicted from Eqs. (8) and (9), in combination with a retention model (Eqs. (1) or (6)) and Eq. (3). The parameters in Eqs.

(8) and (9) can be easily obtained from the peaks obtained at a given flow-rate (e.g. 1 ml min<sup>-1</sup>).

Peak profiles were described using the polynomially modified Gaussian model (PMG), which has demonstrated to fit accurately chromatographic peaks of diverse asymmetry [36,37]:

$$h(t) = h_0 \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t - t_R}{s_0 + s_1 (t - t_R)} \right)^2 \right] \quad (10)$$

where  $h(t)$  and  $h_0$  are the height at time  $t$  and at the maximal peak height, respectively, and:

$$s_0 = 0.466 \frac{\sqrt{\frac{41.7 t_R^2}{N (1.25 + B/A)}}}{1 + \frac{1}{B/A}} \left( 1 - \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \right) \quad (11)$$

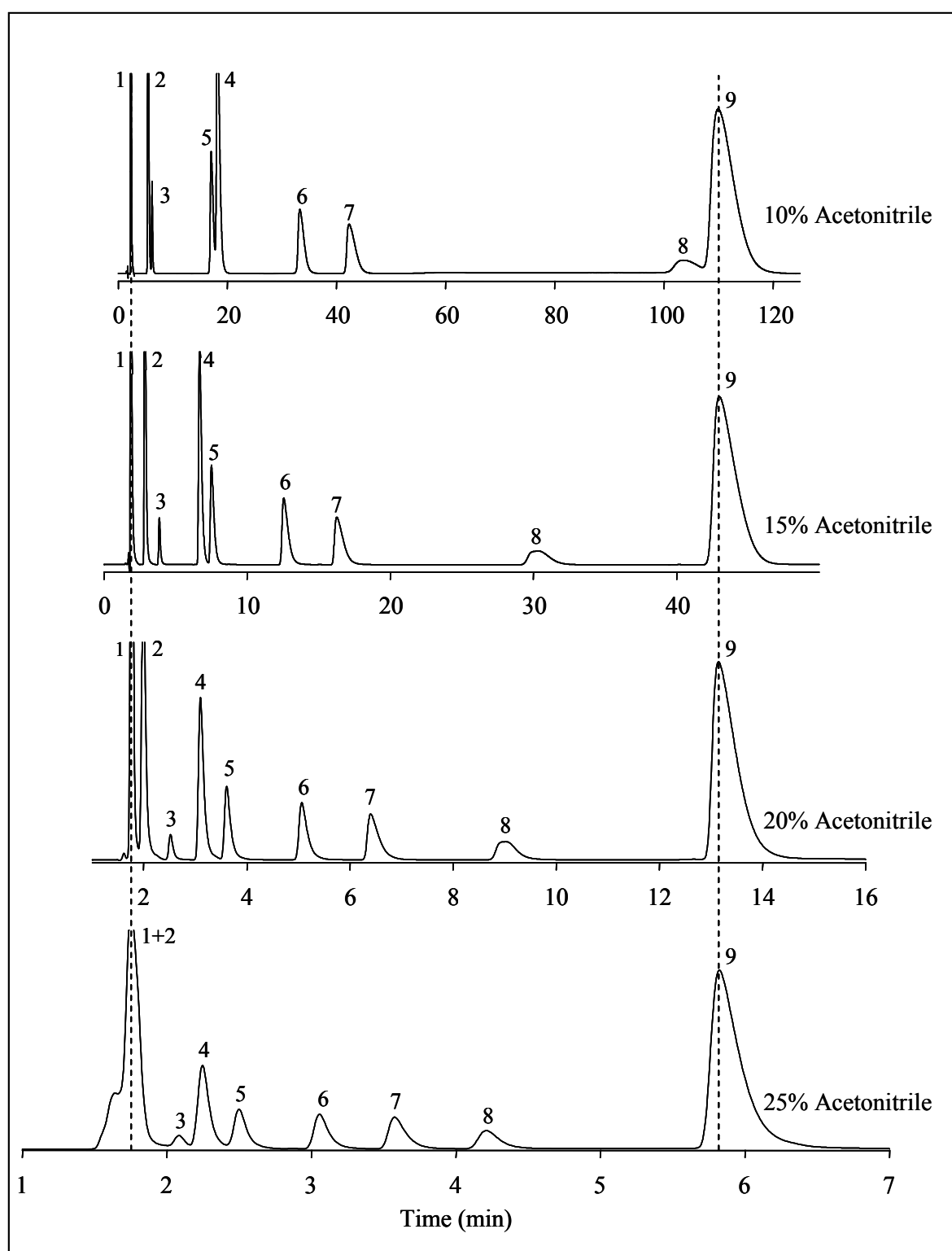
$$s_1 = 0.466 \frac{B/A - 1}{B/A + 1} \quad (12)$$

In order to avoid baseline increases out of the peak region, which would be problematic in the prediction of chromatograms and optimisation of the resolution, a mixed exponential PMG function was used, which was obtained by replacing the outer peak regions by two exponential decays at both sides of the PMG peak at 10% height [38].

### 3.4. Resolution

Fig. 5 shows the chromatograms for a mixture of the nine  $\beta$ -blockers (with timolol again excluded), eluted at 1 ml min<sup>-1</sup> and varying mobile phase composition. The compounds appear resolved in an intermediate solvent content region. We took benefit of the description of the peak retention and shape at varying acetonitrile content and flow-rate to assess the resolution in the whole experimental domain (10–25% acetonitrile and 0.5–5 ml min<sup>-1</sup>).





**Figure 5.** Experimental chromatograms for a mixture of nine  $\beta$ -blockers eluted at 1 ml  $\text{min}^{-1}$  and varying acetonitrile (ACN) content. See Fig. 2 for compound identity.

For this purpose, we used the peak purity concept, which is an intuitive measurement that quantifies the peak area percentage free of interference [39]:

$$p_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (13)$$

where  $o_i'$  is the area under the peak overlapped by a hypothetical chromatogram built with the peaks of the remaining compounds in the mixture, and  $o_i$  the total area of the peak of interest. Peak purities range from zero for full overlapping to one for full resolution. The global separation in the chromatograms was evaluated by combining the elementary peak purities as follows:

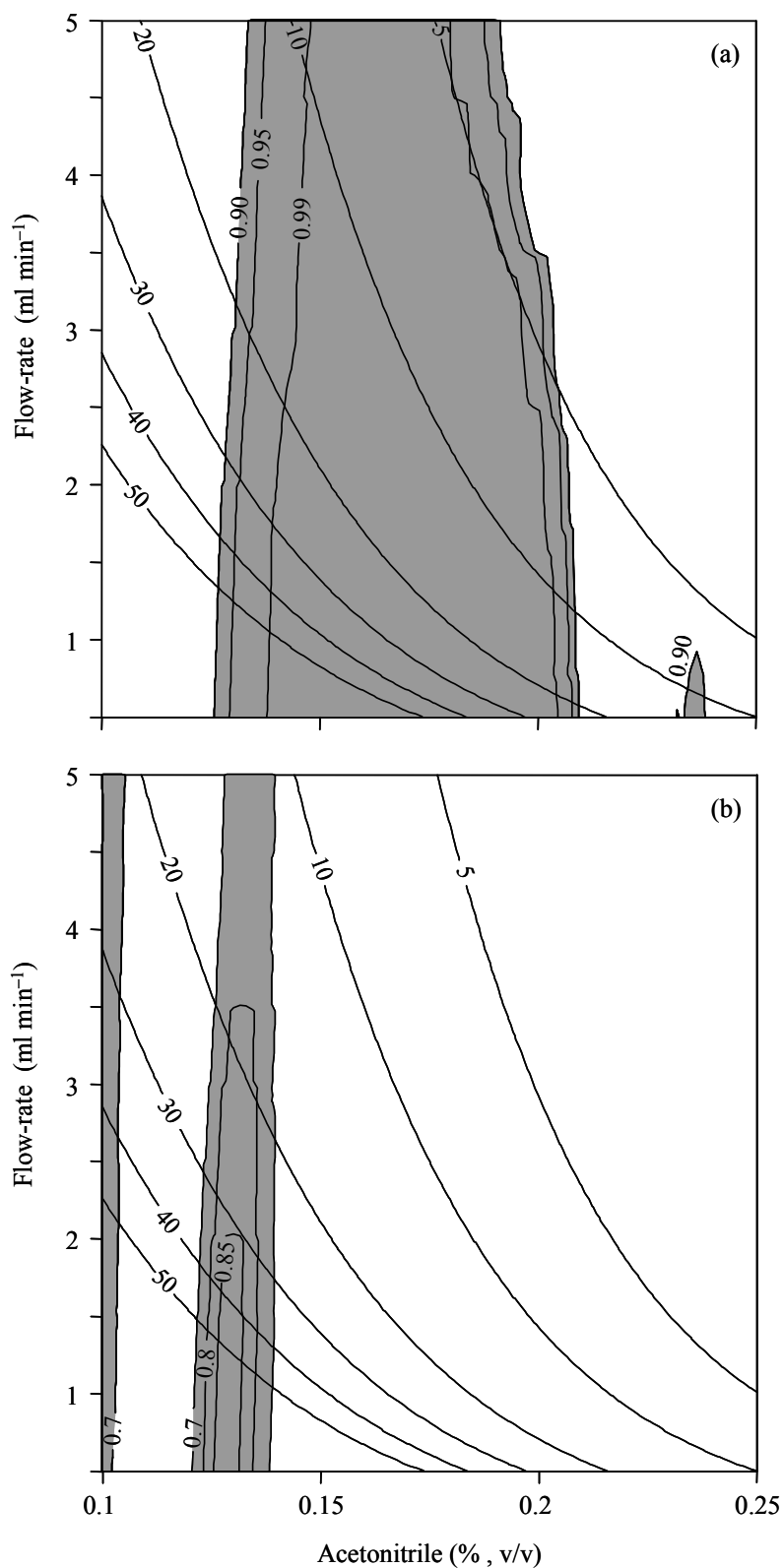
$$P = \prod_{i=1}^n p_i \quad (14)$$

where  $n$  represents the number of peaks [40].

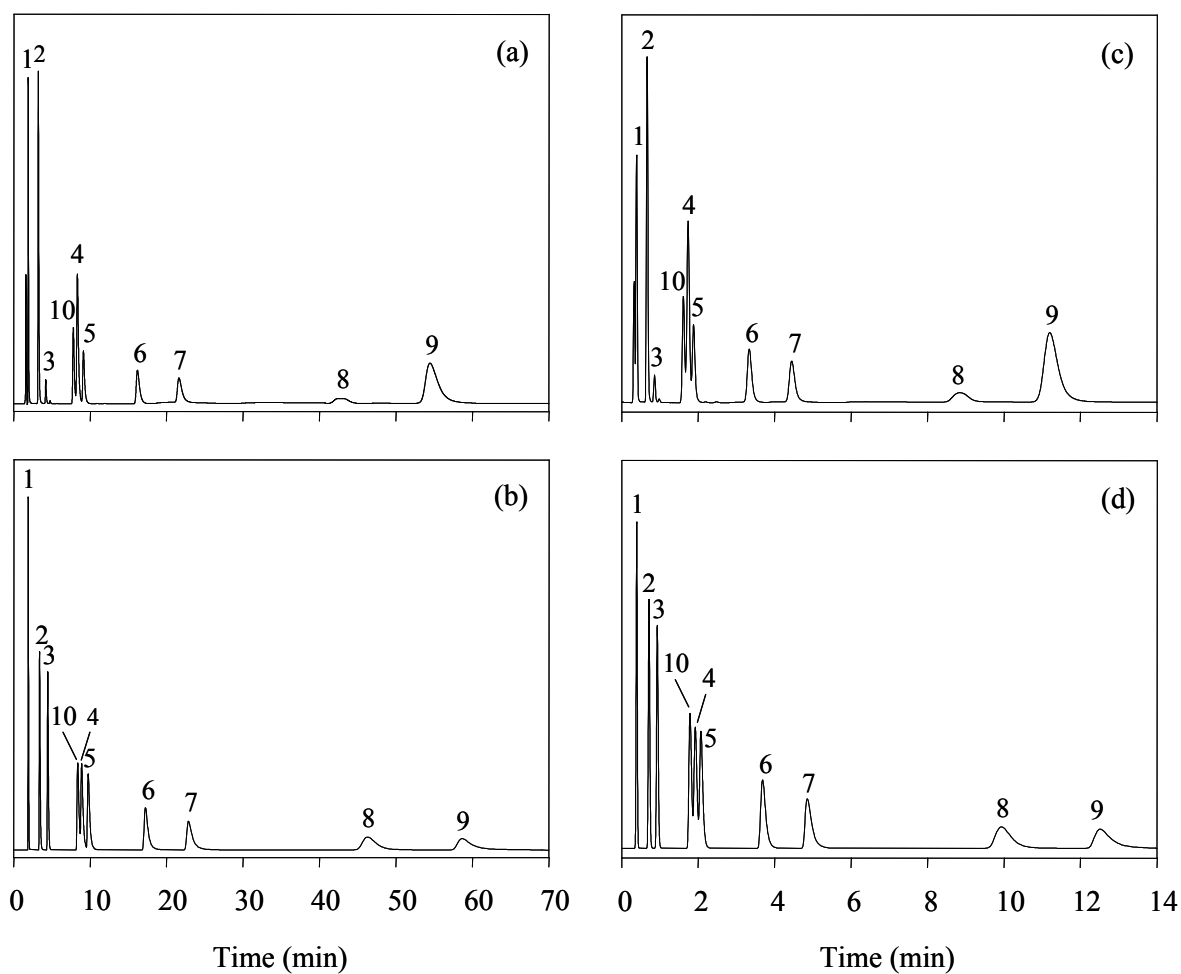
Fig. 6a shows the resolution contour map for the separation of the nine  $\beta$ -blockers at varying acetonitrile content and flow-rate using the Chromolith column. Whole resolution ( $P_{\max} = 0.99$ ) is predicted in a wide central region, which is narrowed at increasing flow-rate due to overlapping of the two early eluting compounds. This progressive overlapping is explained by the reduction in efficiencies at higher flow-rates.

Fig. 6b shows the contour map for a mixture of the ten  $\beta$ -blockers (including now timolol). The structures in the map are again almost parallel, with the region of highest resolution showing an arrow shape. Thus, the resolution is  $P > 0.85$  at  $F < 2 \text{ ml min}^{-1}$ , and  $P > 0.80$  at  $F < 3.5 \text{ ml min}^{-1}$ . In both diagrams, isolines indicating the analysis time (min) were overlaid. This gave a comprehensive description (i.e. resolution and analysis time) of the performance of the Chromolith column in the whole experimental domain.

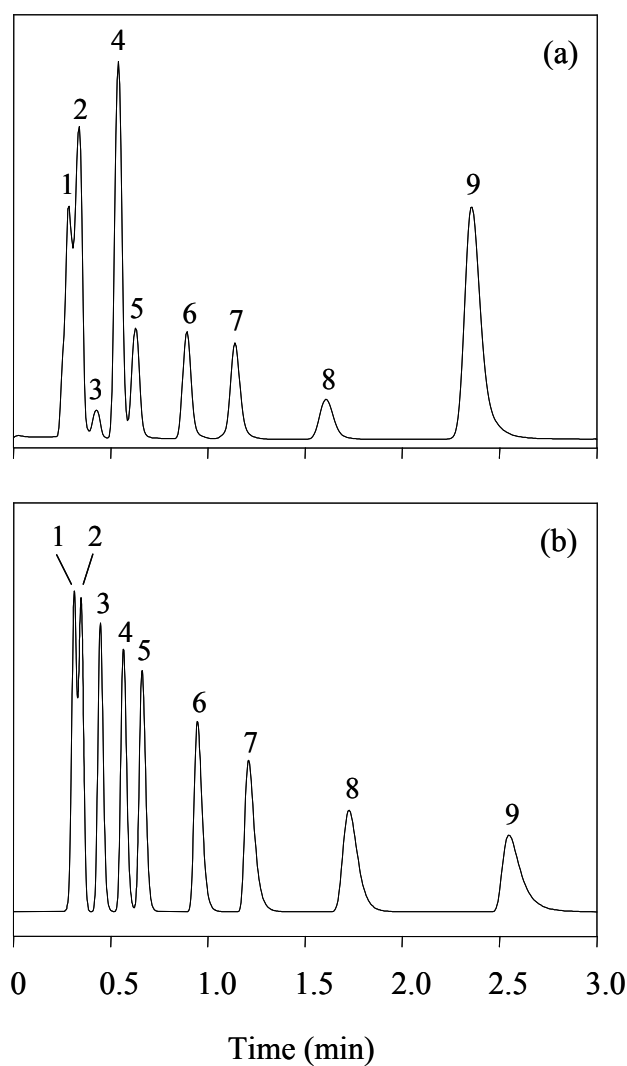
The accuracy of the predictions is demonstrated in Fig. 7, where experimental and predicted chromatograms are compared for the ten  $\beta$ -blockers, eluted at 13.3% acetonitrile and flow-rates of 1 and 5  $\text{ml min}^{-1}$ . The predicted chromatograms were obtained according to Eq. (6), considering normalised areas. Finally, Fig. 8 shows experimental and predicted chromatograms for an extrapolated condition (20% acetonitrile and 6  $\text{ml min}^{-1}$ , which is out of the experimental design). As observed, the agreement is highly satisfactory.



**Figure 6.** Peak purity contour maps for mixtures of: (a) nine  $\beta$ -blockers (without timolol), and (b) ten  $\beta$ -blockers, eluted with mobile phases of acetonitrile at varying flow-rate. Isolines depicting the analysis time (min) are overlaid. The shadowed regions correspond to global peak purities  $P > 0.9$  for (a), and  $P > 0.7$  for (b).



**Figure 7.** Experimental (a,c) and predicted (b,d) chromatograms at 13.3% acetonitrile and: (a,b) 1 ml min<sup>-1</sup>, and (c,d) 5 ml min<sup>-1</sup>. Peak 10 corresponds to timolol. See Fig. 2 for the identity of the other  $\beta$ -blockers. Eq. (6) was used to predict the chromatograms in (b,d).



**Figure 8.** Experimental (a) and predicted (b) chromatograms at 20% acetonitrile and  $6 \text{ ml min}^{-1}$ . See Fig. 2 for compound identity. Eq. (6) was used to predict the chromatograms.

## 4. Conclusions

The interpretive optimisation of the experimental conditions considering both mobile phase composition and flow-rate can be carried out in a similar fashion to the conventional optimisation of mobile phase composition at fixed flow-rate, using Eq. (1) in combination with Eq. (3). Moreover, the model coefficients obtained from runs at varying mobile phase composition (i.e. at least four to assure good accuracy) and fixed flow-rate can be used to predict the retention and peak shape at any other flow-rate. It should be noted, that for this purpose, a dead time marker following Eq. (4) with null intercept should be selected.

The accuracy of the predictions with Eq. (1) for the most retained  $\beta$ -blockers was not entirely satisfactory. The deviations could, however, be corrected by adding another term to the classical quadratic model (Eq. (6)) that correlates  $\log k$  with the flow-rate. The calculation of the corresponding model coefficients needs, however, some additional runs at another flow-rate. With six experimental conditions (at three mobile phase compositions, each one at two flow-rates), all coefficients in Eq. (6) can be obtained with enough accuracy. Another possibility to develop the model is performing an optimisation at a low flow-rate (using the data obtained with three or four mobile phase compositions), and carry out additional runs using the optimal mobile phase at another flow-rate.

The flow-rate level is constraint by instrumental limitations (i.e. pump and detector), and the deterioration of the efficiencies and, consequently, the resolution of the most critical peaks. The interpretive strategy described in this work, whose reliability has been demonstrated, will help the analyst to select the best conditions with monolithic columns, with minimal experimental effort. In any case, it will offer a comprehensive description of the column performance for the analysed sample.

## References

1. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J. High. Resol. Chromatogr. 23 (2000) 93.
2. D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, C. Shaefer, D. Cunningham, LCGC 19 (2001) 1186.
3. N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, J. Chromatogr. A 965 (2002) 35.
4. A.M. Siouffi, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 801.
5. F. Svec, C.G. Huber, Anal. Chem. 78 (2006) 2100.
6. B.A. Olsen, B.C. Castle, D.P. Myers, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 796.
7. K. Nakanishi, N. Soga, Inorganic Porous Column, Japan patent 1993/5–200,392.
8. D. Lubda, E. Muller, Method for Producing Monolithic Chromatography Columns, US patent application 2003/0155676 a1.
9. K. Nakanishi, N. Soga, H. Minakuchi, Capillary Column Including Porous Silica Gel Having Continuous Throughpores and Mesopores, US patent 2003/6,531,060.
10. K. Nakanishi, N. Soga, J. Non-Cryst. Solids 139 (1992,) 1.
11. K. Nakanishi, N. Soga, J. Non-Cryst. Solids 139 (1992) 14.
12. H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Anal. Chem. 68 (1996) 3498.
13. K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, J. Sol-Gel Sci. Technol. 13 (1999) 163.
14. H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, J. Chromatogr. A 954 2002 (2002) 5.
15. K. Cabrera, J. Sep. Sci. 27 (2004) 843.
16. A.M. Siouffi, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 86.
17. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, J. Chromatogr. A 1036 (2004) 127.
18. K. Mistry, N. Grinberg, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 28 (2005) 1055.
19. N. Wu, J. Dempsey, P.M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvratt, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 149.
20. F. Svec, L. Geiser, LCGC 24 (2006) 22.
21. A.M. van Nederkassel, A. Aerts, A. Dierick, D.L. Massart, Y. Vander-Heyden, J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) 233.

22. J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 579 (2006) 125.
23. S. Pous-Torres, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 117.
24. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 107.
25. J.R. Torres-Lapasió, M. Rosés, E. Bosch, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 886 (2000) 31.
26. M.J. Ruiz-Ángel, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 51.
27. S. Pous-Torres, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 49.
28. U.D. Neue, *HPLC columns: Theory, Technology and Practice*, Wiley, New York, 1997.
29. L. Kaminski, S. El Deeb, H. Wätzig, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1745.
30. M. Hermann, H. Christensen, J.L.E. Reubsæet, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1263.
31. Y. Ping. Zhang, Y.J. Zhang, W.J. Gong, A.I. Gopalan, K.P. Lee, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 183.
32. Y.C. Guillaume, E. Peyrin, *Talanta* 51 (2000) 579.
33. T. Sivakumar, R. Manavalan, C. Muralidharan, K. Valliappan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1842.
34. J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 57 (1983) 730.
35. J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 17.
36. J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
37. P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 13.
38. G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, A.M. van Nederkaassel, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 146.
39. S.J. López-Grío, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 187.
40. S. Carda-Broch, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 61.



## Chapter 8

### **Performance of a Chromolith RP-18e column versus microparticulate columns for the screening of $\beta$ -blockers**

#### **Summary**

The chromatographic performance of a monolithic column (Chromolith RP-18e) in the isocratic separation of ten  $\beta$ -blockers, using acetonitrile-water mobile phases, was comprehensively compared with the performance of three microparticulate reversed-phase columns manufactured with different types of silica: Spherisorb ODS-2 (type A), Kromasil C18 (type B) and XTerra MS C18 (type B combined with methylsilane). The comparison considered the analysis time, selectivity, peak shape (column efficiency and asymmetry) and resolution, and was extended to a wide range of mobile phase compositions. The Chromolith column showed good performance for the analysis of  $\beta$ -blockers with regard to the packed columns. In terms of selectivity and analysis time, the greatest similarity was found between the Chromolith and the XTerra columns, whereas the Spherisorb column exhibited a similar elution strength pattern to Chromolith. The addition of a silanol blocking agent (0.1% triethylamine) to both Chromolith and Spherisorb columns yielded, apparently, a similar blocking degree of the silanol groups (based on the similar peak shapes), and gave rise to similar selectivity.

## 1. Introduction

The need for obtaining high quality analysis in short times is of major importance in the pharmaceutical industry, where the number of samples to be assayed is continuously increasing [1–4]. In drug development, a large number of new drugs and products have to be tested to evaluate their purity. Many pharmaceutical companies have been involved with combinatorial chemistry with the purpose of searching more effective drugs. This results in thousands of new compounds each month, which should be analysed quickly. Also, fast separations are usually highly desirable to control a process (i.e. checking of the reaction completion and by-products) and for quality control before releasing a batch. For this purpose, reversed-phase liquid chromatography (RPLC) is usually employed. However, the standard separations are too time-consuming for the screening of so many samples (15 to 20 min mean run times). Thus, any development to speed up analytical methods is been encouraged to drastically reduce analysis times, as this implies larger throughput, and consequently, lower cost. Likewise, the columns should be highly robust to operate 24 h per day. Consequently, in the last decade, fast RPLC separations have constituted an area of extensive research.

The pressure limitation of commercially available chromatographic systems (usually 400 bar) clearly sets the limits for fast chromatography. But even if this is overcome, conventional microparticulate packed columns are damaged by the excessive pressure associated to high flow-rates [5]. Diverse approaches have been considered to face this limitation: use of microparticulate short columns at high flow-rate [6–8], special packings with reduced retention [9], high temperature [10], reduced particle size at ultra-high pressure [11], and silica-based monolithic columns [2,12,13]. With shorter microparticulate columns, efficiency and resolution are considerably compromised, and high temperatures or ultra-high pressures require special chromatographic equipment. In contrast, monolithic columns can be used with conventional equipment, and run at high flow-rate with lower backpressure, extended column life-time, and smaller loss in efficiency at increasing flow-rate, with regard to conventional microparticulate columns [14–16]. Note that when operating at high flow-rate, the total solvent consumption per analysis is comparable with that of conventional methods at low flow-rate.

A silica-based monolithic column consists of a rod prepared inside a mould, by polymerisation of highly purified metal-free tetramethoxysilane in the presence of polyethylene glycol as porogen [17]. After aging and treatment at high temperature, the rod is removed from the mould, encased within a PEEK tube [18], and provided with the bonded chemistry for RPLC separations, followed by endcapping [19]. These columns were first marketed by Merck KGaA (Darmstadt, Germany), under the trade name Chromolith [1]. Later, Phenomenex (Torrance, CA, USA) began to commercialise the Onyx columns, licensed from Merck KGaA. The available RP-18e 4.6 mm i.d. columns are the following (column length): Chromolith Flash (25 mm), Chromolith SpeedROD (50 mm), and Chromolith Performance (100 mm).

The highly porous monolithic rods of silica provide a unique combination of macropores ( $\sim 2.2\ \mu\text{m}$ ) and mesopores ( $\sim 13\ \text{nm}$ ) [20]. The former allow rapid flow of the mobile phase at low backpressure, while the latter create a large uniform surface on which adsorption takes place, thereby enabling RPLC separation. Owing to their characteristics, silica-based monolithic columns are a field of continuous research in RPLC. The emergence of these stationary phases in the market has favoured the development of analytical applications that involve mainly pharmaceutical and environmental compounds [16].

So far, the practical use of silica-based monolithic columns in RPLC has not been as wide as expected, in spite of all their advantages. A complete understanding of their performance requires the systematic acquisition of many series of reliable experimental data in a wide range of chromatographic conditions, and on the consistent analysis and interpretation of these data from different points of view [21,22].

With the aim of characterising silica-based monolithic columns, numerous authors have compared them with microparticulate packed columns. Most authors reached the conclusion that the columns are comparable with regard to their selectivity and reproducibility [23–34], but the monolithic columns seem to be more stable than the packed ones, due to the rigid silica structure [20]. Some results from comparison studies are outlined in Table 1.

**Table 1.** Reports where Chromoliths are compared with microparticulate columns.

Chromolith	Other columns	Compounds	Details	Ref.
Prototypes of Silica rod columns from Merck (100 × 4.6 mm)	Purospher RP-18e (5 µm, 125 × 4 mm, Merck)	Uracil, toluene, ethylbenzene, <i>n</i> -propylbenzene, <i>n</i> -butylbenzene, <i>n</i> -pentylbenzene	Comparison of plate height ( <i>H</i> ), permeability and column back pressure versus flow rate plots. Mobile phase: 73:27 acetonitrile-water Flow-rate: 0.2–6 ml/min for the monolithic columns, 0.5–3 ml/min for Purospher	23
SpeedROD (50 × 4.6 mm)	Superspher 100 RP18 (125 × 3 mm, Merck)	Ochratoxin A	Comparison of elution orders and selectivities. Mobile phase: 68.5:29:2.5 methanol-water-acetic acid	24
Silica rod columns (100 × 4.6 and 50 × 4.6 mm)	LiChroCART Purospher RP-18e (5 µm, 125 × 4 mm, Merck) LiChroCART Purospher STAR 18e (3 µm, 55 × 4 mm, Merck)	Butylbenzene, <i>o</i> -terphenyl, amylbenzene, triphenylene	Comparison of elution orders and selectivities. Mobile phase: 80:20 methanol-water	18
SpeedROD	Zorbax SB-C18 (5 µm, 50 × 2.1 mm, Agilent) Zorbax RX-C8 (5 µm, 150 × 2.1 mm, Agilent)	Debrisoquine metabolites	Coupling to mass spectrometry. Comparison of retention times, peak widths, resolutions and selectivities. Mobile phase: 0–25% acetonitrile	25
Performance RP-18e (100 × 4.6 mm)	LiChrospher 100 RP-18e (5 µm, 125 × 4.6 mm, Merck) RP-Amide C16 (150 × 2.1 mm, Supelco)	Microcystins and nodularin-R	Comparison of retention times, resolutions and selectivities. Mobile phase: TFA-acetonitrile gradients. Flow-rate: 2–4 ml/min for the monolithic column, 1.0–1.5 ml/min for LiChrospher	26

**Table 1** (continued).

Chromolith	Other columns	Compounds	Details	Ref.
Performance RP-18e	Hypersyl (250 × 4.6 mm) Kromasil (250 × 4.6 mm) Phenomenex Luna (150 × 4.6 mm) Symmetry (150 × 3.9 mm, Waters) Vydac (250 × 4.6 mm)	Phenol and caffeine	Measurement of adsorption isotherms of solutes. Mobile phase: 30:70 methanol-water Flow-rate: 1 ml/min	27
Performance RP-18e, RP-8e and RP-4e	LiChrospher RP-18e (Merck) Zorbax SB300-C18 (Agilent) PurospherSTAR RP-18e (3 µm, 55 × 4.0 mm) (Merck)	Caffeine, acetone, angiotensin II, insulin and bovine serum albumin	Comparison of pressure drops, efficiencies and adsorption capacities. Mobile phase: 50:50 acetonitrile:water Flow-rate: 100–2500 µl/min	28
SpeedROD RP-18e	Symmetry (3.5 µm, 50 × 4.6 mm, Waters) Phenomenex Luna (5 µm 50 × 4.6 mm) XTerra (3 µm, 50 × 3.0 mm, Waters) Optimize velocity (3 µm, 50 × 4.6 mm) Varian Chrompack (3 µm, 50 × 4.6 mm)	Benzamide, <i>N</i> -methylbenzamide, biphenyl, acetophenone, benzyl alcohol, ethylparaben, propylparaben	Comparison of selectivities, re-equilibration times and precisions Mobile phase: acetonitrile-water gradients Flow-rate: 1 to 9 ml/min for SpeedROD	29
SpeedROD RP-18e and Performance RP-18e	LiChrospher 100 RP-18e (250 × 4.6 mm, Merck) Alltima C8 LiChroCART Purospher RP-18e (125 × 4 mm, Merck)	Nimesulide, tetracycline, erythromycin and phenoxymethylpenicillin	Transfer to monolithic columns of separation methods. Mobile phase: Acetonitrile-water and methanol-water mixtures Flow-rate: 1–9 ml/min for the monolithic	30

**Table 1** (continued).

Chromolith	Other columns	Compounds	Details	Ref.
Performance RP-18e	17 conventional microparticulate columns	58 neutral compounds	Observation of similar retention properties using the solvation parameter model.	31
Performance RP-18e and SpeedROD RP-18e	YMC C18 (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm and 3 $\mu$ m, 150 $\times$ 4.6 mm, Waters) Zorbax C18 (3.5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Agilent)	Phenol, alkylbenzenes (CnH2n+1C6H5, $n = 0-7$ ) and <i>N,N</i> -dimethylaniline	Comparison of pressure drops, retentions, selectivities and asymmetries. Mobile phase: acetonitrile-water mixtures Flow-rate: 1.5 ml/min	2
Performance RP-18e, SpeedROD RP-18e and Flash RP-18e (25 $\times$ 4.6 mm)	Discovery (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 3 mm, Supelco)	Methyl-, ethyl- and propylparaben, ketoprofen, estradiol, hydrocortisone and estrone	Comparison of resolutions, retention times, efficiencies and peak widths. Mobile phase: acetonitrile-water mixtures Flow-rate: 1.0–5.0 ml/min	32
Performance RP-18e	YMC ODS (150 $\times$ 3 mm) LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4 mm) Symmetry RP-18 (3.5 $\mu$ m, 150 $\times$ 3 mm)	Methyl-, ethyl-, propyl- and butylparaben	Comparison of resolutions, retentions, efficiencies and peak widths. Mobile phase: acetonitrile-water gradients Flow-rate: 1–3 ml/min for the monolithic column, 1 ml/min for the microparticulate columns	5
Performance RP-18e	Luna ODS (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Phenomenex) Purospher RP-18 (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Merck) Synergi RP-MAX C12 (4 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Merck)	11 phenols	Comparison of van Deemter plots and asymmetries Mobile phases: acetonitrile-water mixtures Flow-rate: 0.5–1 ml/min for microparticulate columns and 1–4 ml/min for the monolithic column	33
Performance RP-18e	Pecosphere C18 (5 $\mu$ m, 150 $\times$ 4.6 mm, Perkin Elmer)	Vitamins A and E	Comparison of retentions and backpressures Mobile phase: 100% methanol Flow-rate: 2.5 ml/min for the monolithic	34

In this work, the Chromolith Performance RP-18e column is compared, in terms of elution strength, selectivity, peak shape and resolution capability, with three microparticulate columns (Spherisorb ODS-2, Kromasil C18 and XTerra MS C18), in the separation of ten  $\beta$ -blockers with acetonitrile-water mobile phases in a wide composition range.  $\beta$ -Blockers are basic drugs of pharmacological interest that allow probing the residual silanols on each column.

## **2. Experimental**

### **2.1. Reagents**

The chromatographic behaviour of the following  $\beta$ -blockers was examined: acebutolol (Italfarmaco, Alcobendas, Madrid, Spain), atenolol, pindolol, propranolol, timolol (Sigma, St. Louis, MO, USA), carteolol (Miquel-Otsuka, Barcelona, Spain), esmolol (Du Pont-De Nemours, Le Grand Saconnex, Switzerland), labetalol (Glaxo, Tres Cantos, Madrid), metoprolol, and oxprenolol (Ciba-Geigy, Barcelona). The drugs were dissolved in a small amount of methanol and diluted with water. The concentrations of the stock solutions were  $100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ . These solutions remained stable during at least two months at  $4^{\circ}\text{C}$ .

The mobile phases were prepared with acetonitrile (Scharlab, Barcelona). The pH was buffered at 3 with 0.01 M disodium hydrogenphosphate and addition of HCl (Panreac, Barcelona). Occasionally, 0.1% triethylamine (Fluka, Busch, Switzerland) was added to the acetonitrile-water mixtures. Nanopure water (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA) was used throughout. The drug solutions and mobile phases were filtered through  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  nylon membranes (Osmonics, Herental, Belgium) with a diameter of 47 mm (Magna) and 17 mm (Cameo), respectively.

## **2.2. Apparatus and columns**

The HPLC system was equipped with an isocratic pump (Agilent 1200, Waldbronn, Germany), an autosampler and a UV-visible detector (Series 1100) set at 225 nm, except for timolol which was monitored at 300 nm. The sampling period was 400 ms. Triplicate injections were made with an injection volume of 20  $\mu\text{l}$  and a flow-rate of 1  $\text{ml min}^{-1}$ . Data acquisition was carried out with an HPChemStation (Agilent), and the mathematical treatment was performed in MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, USA).

Four columns of different nature were used (Table 2), each of them connected to a guard column of similar characteristics: Chromolith Performance RP-18e (Merck), Spherisorb ODS-2 (Scharlab), Kromasil C18 (Análisis Vínicos, Ciudad Real, Spain), and XTerra MS C18 (Waters, MA, USA).

The dead time values ( $t_0$ ), measured with uracil (Acros Organics, Geel, Belgium) as marker were: Chromolith ( $t_0 = 1.58$  min), Spherisorb (1.27 min), Kromasil (1.57 min), and XTerra (1.65 min).

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Columns and probe compounds**

The performance of the Chromolith RP-18e column in the separation of  $\beta$ -blockers was compared with the performance of three different types of packed columns: Spherisorb ODS-2, Kromasil C18 and XTerra MS C18. These columns are manufactured of silica-based materials that belong to the same category (USP L1) [37], which means that they contain octadecylsilane chemically bonded to porous silica with microparticles within the range 3 to 10  $\mu\text{m}$  in diameter. Although the technology used to prepare silica-based monolithic columns is different to that for conventional silica-based particle columns, it can result in materials for RPLC with similar characteristics [31]. Table 2 compares the physico-chemical properties of the four columns.



**Table 2.** Physico-chemical properties of the four columns used in this work.

	Chromolith RP-18e <sup>a</sup>	Spherisorb ODS-2 <sup>b</sup>	Kromasil C18 <sup>c</sup>	XTerra MS C18 <sup>d</sup>
Particle size (µm)	–	5	5	5
Mesopore size (Å)	130	80	100	120
Macropore size (µm)	2	–	–	–
Surface area (m <sup>2</sup> /g)	300	220	340	175
Total carbon (wt %)	19.5	12	20	15
Surface coverage (µmol/m <sup>2</sup> )	3.6	2.8	3.6	2.4
Endcapping	Yes	Yes	Yes	Yes
Dimensions (mm × mm)	100 × 4.6	125 × 4.6	150 × 4.6	150 × 4.6
Total porosity	> 0.80	–	0.59	0.62
pH stability range	2.0–7.5	3.0–7.5	2.0–9.0	1.0–12.0

<sup>a</sup> Ref. [21]. <sup>b</sup> [www.analyticalcolumns.com](http://www.analyticalcolumns.com). <sup>c</sup> Ref. [35]. <sup>d</sup> Ref. [36].

Spherisorb ODS-2 is, perhaps, the most widely referenced RPLC column in the scientific literature, providing a tremendous range of validated methods and applications. Kromasil columns are a further development, very popular for both pharmaceutical and bioscience industries, and extends the packing stability from pH 7.5 to 9. XTerra belongs to more recent advances in silica-based stationary phases, and incorporates a hybrid particle that is a combination of silica and organic (methylsilane) components that facilitate stability up to pH 12.

Spherisorbs correspond to an older design and contain type-A silica (according to the classification proposed by Kirkland [38]). To our knowledge, Kromasils, Chromoliths and XTerras are made of highly purified type-B silica [39], which appeared over the last 20 years as the result of improved column manufacturing processes. Type-B silica allows an increase in the average surface coverage ( $3.2 \pm 0.7 \mu\text{mole m}^{-2}$  versus  $2.5 \pm 0.7 \mu\text{mole m}^{-2}$  for type-A C18 columns) [40]. XTerra columns are atypical type-B phases with lower bonded phase coverage ( $2.4 \mu\text{mole m}^{-2}$ ). Type-A columns are more acidic than type-B ones, owing to the presence of isolated silanols in the silica matrix and contaminating metals (e.g. Fe and Al) [41].

$\beta$ -Blockers are drugs administered to treat high blood pressure, cardiovascular, neurological and neuropsychiatric disorders [42]. Therefore, there is great interest in the development of procedures to control them in physiological samples. These drugs have been also used as probe compounds with different types of columns, including Chromoliths, due to their basic nature. Thus, the separation of a test mixture of five  $\beta$ -blockers (atenolol, pindolol, metoprolol, celiprolol and bisoprolol) was reported to show the performance of a Chromolith SpeedROD RP-18e at high flow-rates up to  $9 \text{ ml min}^{-1}$ , where the five components were eluted in less than 1 min [1,18]. Also, the advantageous application of flow gradients with a Chromolith Performance RP-18e was demonstrated with a test mixture of nine  $\beta$ -blockers (pindolol, nadolol, pafenolol, metoprolol, celiprolol, carazolol, bisoprolol, alprenolol and propranolol) [18].

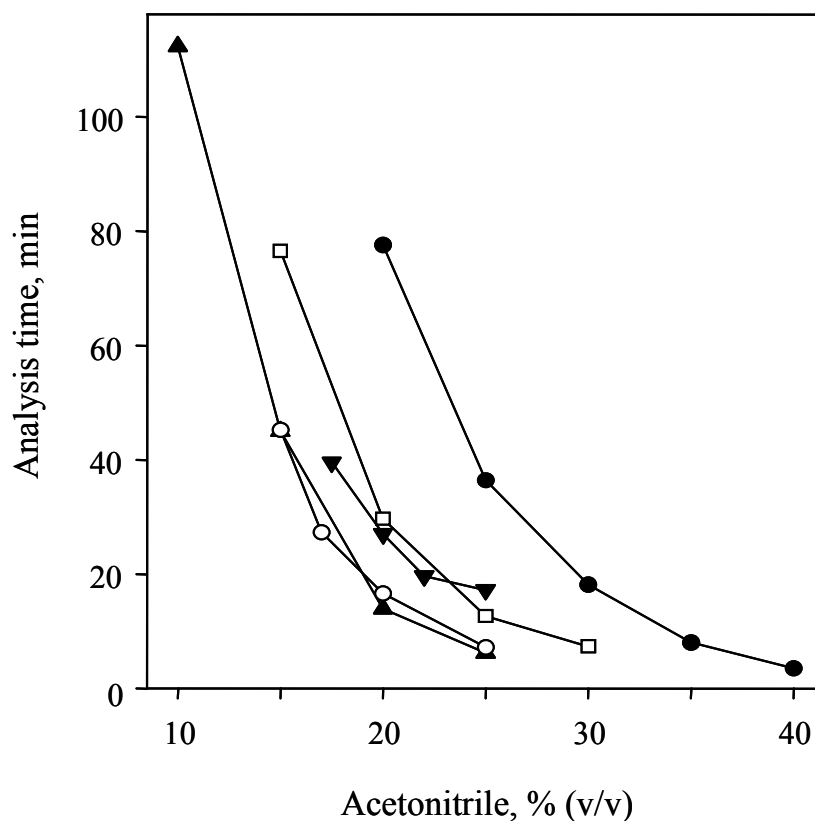
The results of a comparative study of the four columns (Chromolith Performance RP-18e, Spherisorb ODS-2, Kromasil C18, and XTerra MS C18), used to separate ten  $\beta$ -blockers (acebutolol, atenolol, carteolol, esmolol, labetalol, metoprolol, oxprenolol, pindolol, propranolol and timolol), most of them in the mid-polarity range (logarithm of octanol-water partition coefficient,  $\log P$  between 1.2 and 2.6) [43], are shown below.

The retention capability, selectivity, possibility of transferring results between columns, peak shape, and resolution performance, are examined. The comparisons were made at a flow-rate of  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Monolithic columns allow the application of higher flow-rates within the operational pressure limits of conventional equipment, which implies a decrease in the analysis time. However, the selectivity is not changed by an increase in flow-rate. Also, the separation is better at  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , since the resolution of close peaks can be compromised due to the relative increase in peak width at increasing flow-rate [22].

### **3.2. Modelling of the retention**

The  $\beta$ -blockers were eluted with mobile phases of acetonitrile-water at several mobile phase compositions: 10, 15, 20 and 25% acetonitrile (v/v) for the Chromolith column; 20, 25, 30, 35 and 40% acetonitrile for the Spherisorb; 15, 20, 25 and 30% acetonitrile for the Kromasil; and 15, 17, 20 and 25% acetonitrile for the XTerra. The solvent content ranges assayed with the different columns coincided only partially, since they were selected to achieve enough retention for the less retained compound, and not excessively retention for the most retained compound in each column. Thus, the longer retention times (i.e. smaller elution strength) achieved for the Spherisorb column, at the same mobile phase composition, forced the use of larger acetonitrile contents. This is illustrated in Fig. 1, where the analysis time (i.e. the retention time of the most retained compound) is correlated to the solvent content.

Several authors have pointed out shorter retention times with Chromoliths, compared to other columns with the same surface area and similar dimensions [2,18]. In that case less organic modifier is needed to obtain similar retention factors. The lower retention of Chromoliths has been explained by its high porosity and low density. This results in a smaller surface area per unit volume or lower phase ratio [2]. However, Fig. 1 shows that for the  $\beta$ -blockers, the analysis time for the Chromolith column is similar to that of the XTerra.

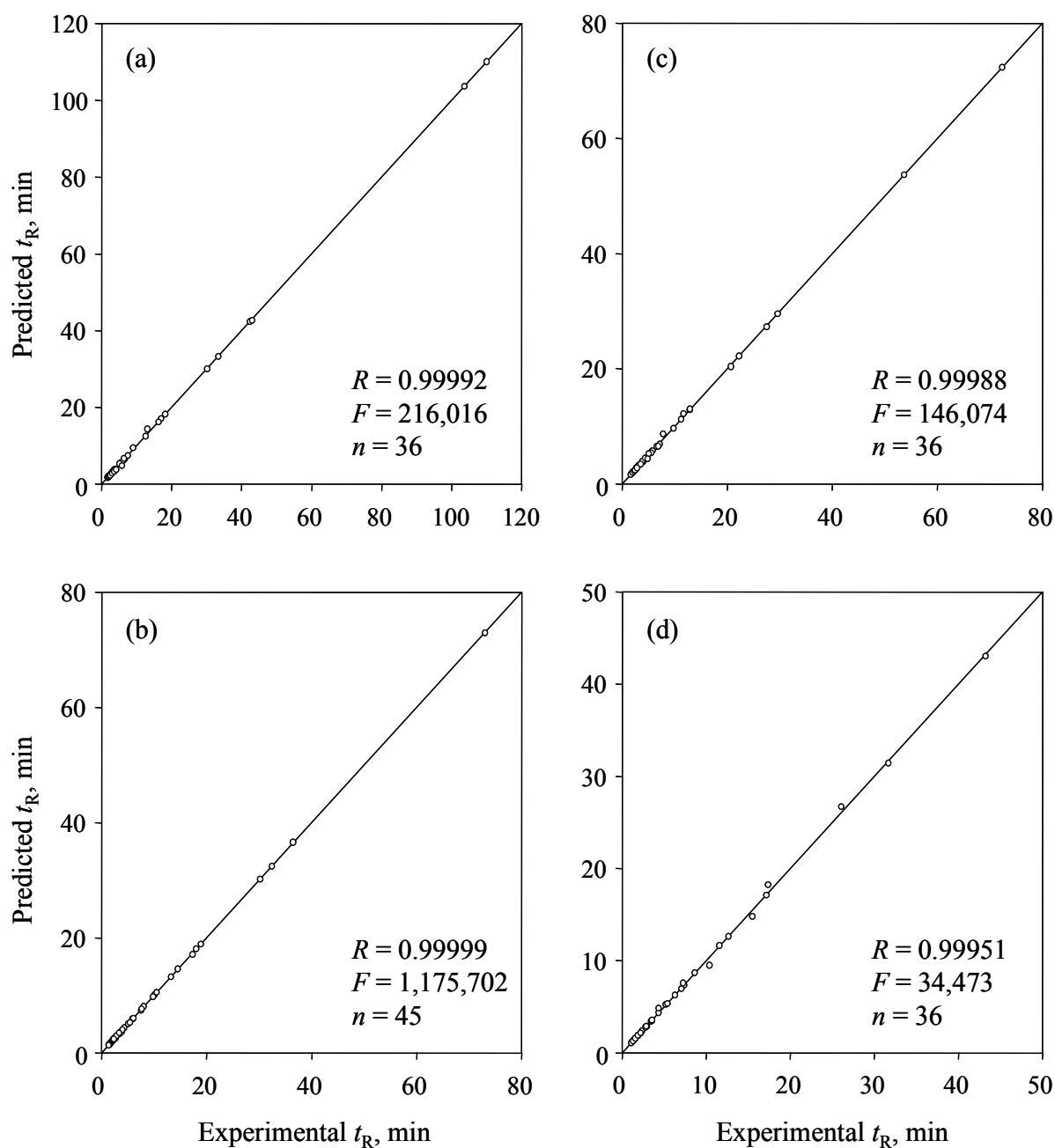


**Figure 1.** Analysis time versus mobile phase composition for the different columns: Chromolith (▲), XTerra (○), Spherisorb in the presence of TEA (▼), Kromasil (□), and Spherisorb (●).

In order to make a comprehensive examination of the retention capability of the four columns in the analysis of the  $\beta$ -blockers, the behaviour of each compound (measured as logarithm of the retention factor,  $\log k$ ) was modelled versus the volume fraction of organic solvent in the aqueous-organic mobile phase,  $\varphi$ , using the classical quadratic relationship:

$$\log k = c_0 + c_1 \varphi + c_{11} \varphi^2 \quad (1)$$

where  $c_0$ ,  $c_1$ , and  $c_{11}$  are regression coefficients with characteristic values for a given solute and column/solvent system. Fig. 2 shows the satisfactory accuracy of Eq. (1) in predicting the retention of the  $\beta$ -blockers for the four columns. This model was used to simulate chromatograms at different mobile phase compositions and predict the resolution performance of each column.



**Figure 2.** Accuracy in the predictions of the retention using Eq. (1) for the ten  $\beta$ -blockers: (a) Chromolith, (b) Spherisorb, (c) Kromasil, and (d) XTerra.

### 3.3. Selectivity

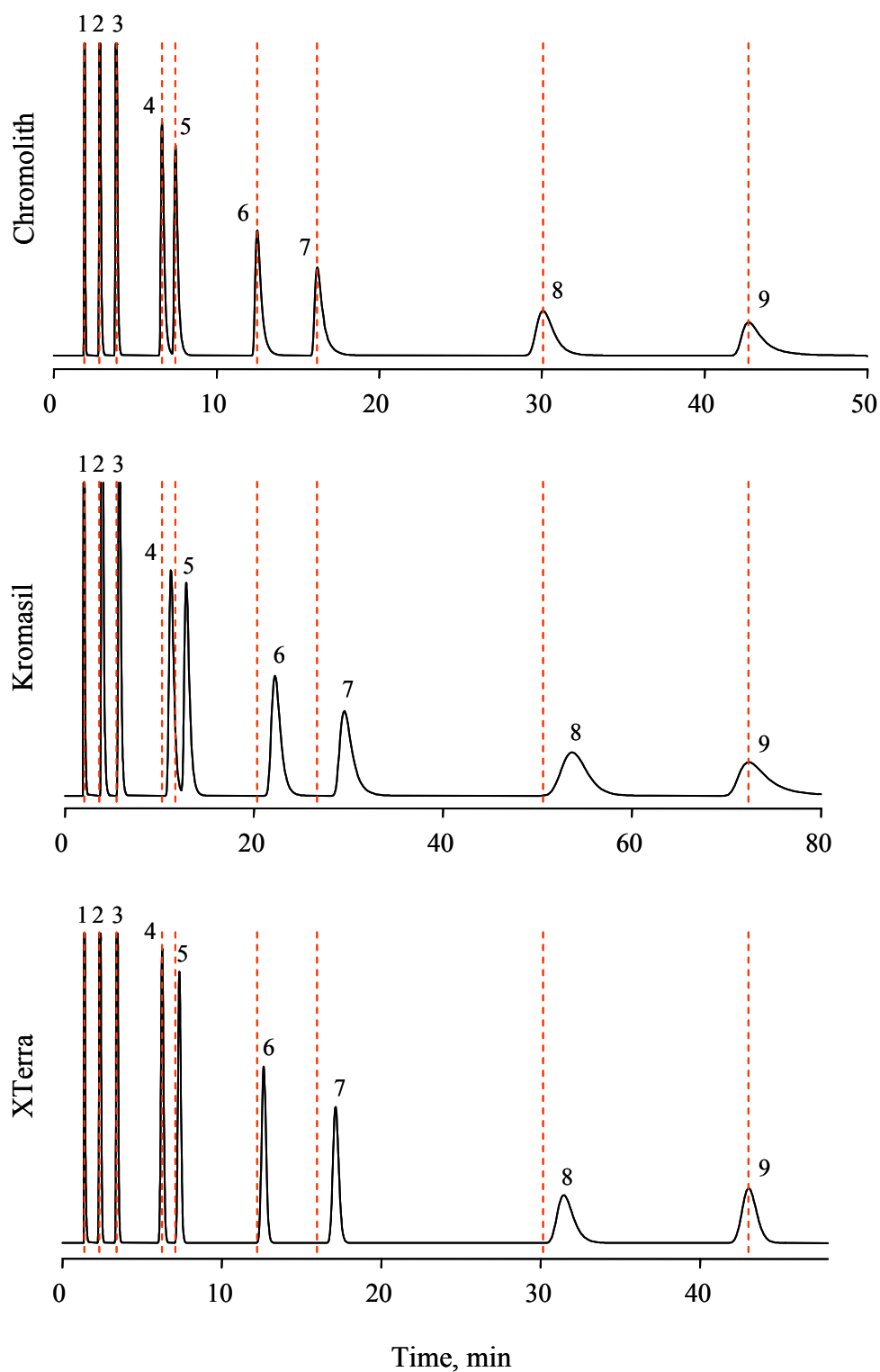
The separation mechanisms, and consequently, the selectivity for a given column, are determined by the surface chemistry (surface bonding and endcapping). Accordingly, several authors have commented the similarities between the Chromoliths and several packed C18 columns (see Table 1) [2,16,18]. In these studies, the selectivity values ( $\alpha$ ) of several selected peak pairs are often compared [29,31]:

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (2)$$

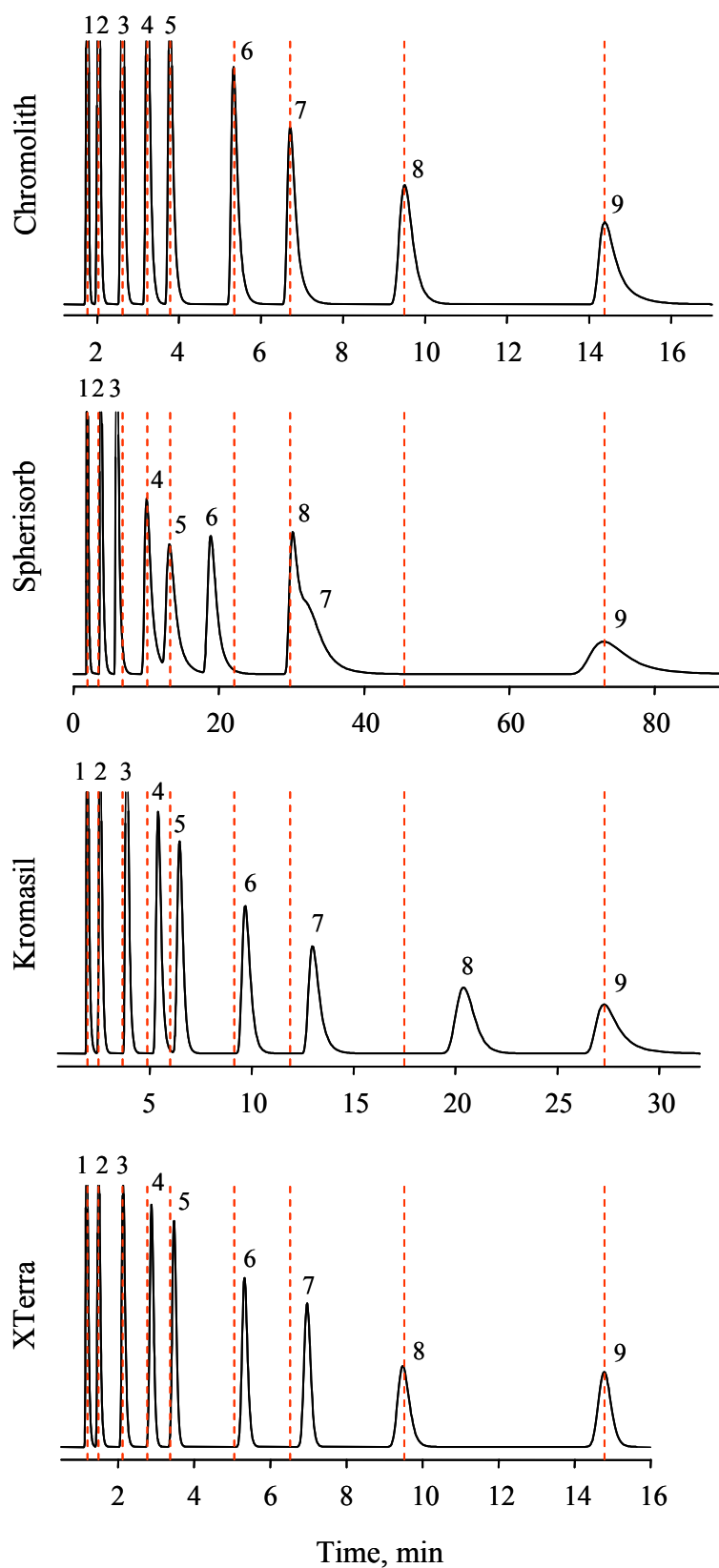
where  $k_1 > k_2$ . However, these comparisons are not comprehensive, as they are usually made at a unique mobile phase composition (at most, a few mobile phase compositions), finding diverse agreement for different peak pairs. In two of these studies, a high similarity between the Chromolith SpeedROD RP-18e and an XTerra column was observed for a test mixture of seven components in a wide polarity range [29], and between the Chromolith Performance RP-18e and LiChrospher 100 RP-18 columns, for a group of 17 aromatic compounds [31].

Figs. 3–5 show the chromatograms obtained at 15, 20 and 25% acetonitrile (only 20 and 25% for the Spherisorb column, which offered smaller elution strength) for a mixture of nine  $\beta$ -blockers (timolol, which overlaps at least partially with acebutolol and metoprolol was excluded). The timescale of the chromatograms was adjusted to an equivalent size to facilitate the comparison. Note that for this purpose, the maximum of the first and last peaks were matched in all chromatograms.

The elution order in the chromatograms was the same for the Chromolith, Kromasil and XTerra columns, as has been commented by other authors for different columns and compounds [5,33]. However, oxprenolol and labetalol changed their elution order with the Spherisorb column. Maximal similarity was found between the chromatograms obtained with the Chromolith and XTerra columns (see Figs. 3 and 4), considering both the peak distribution (i.e. selectivity) and analysis time. However, at higher solvent content (25% acetonitrile), the peak distribution in these columns differed (Fig. 5).

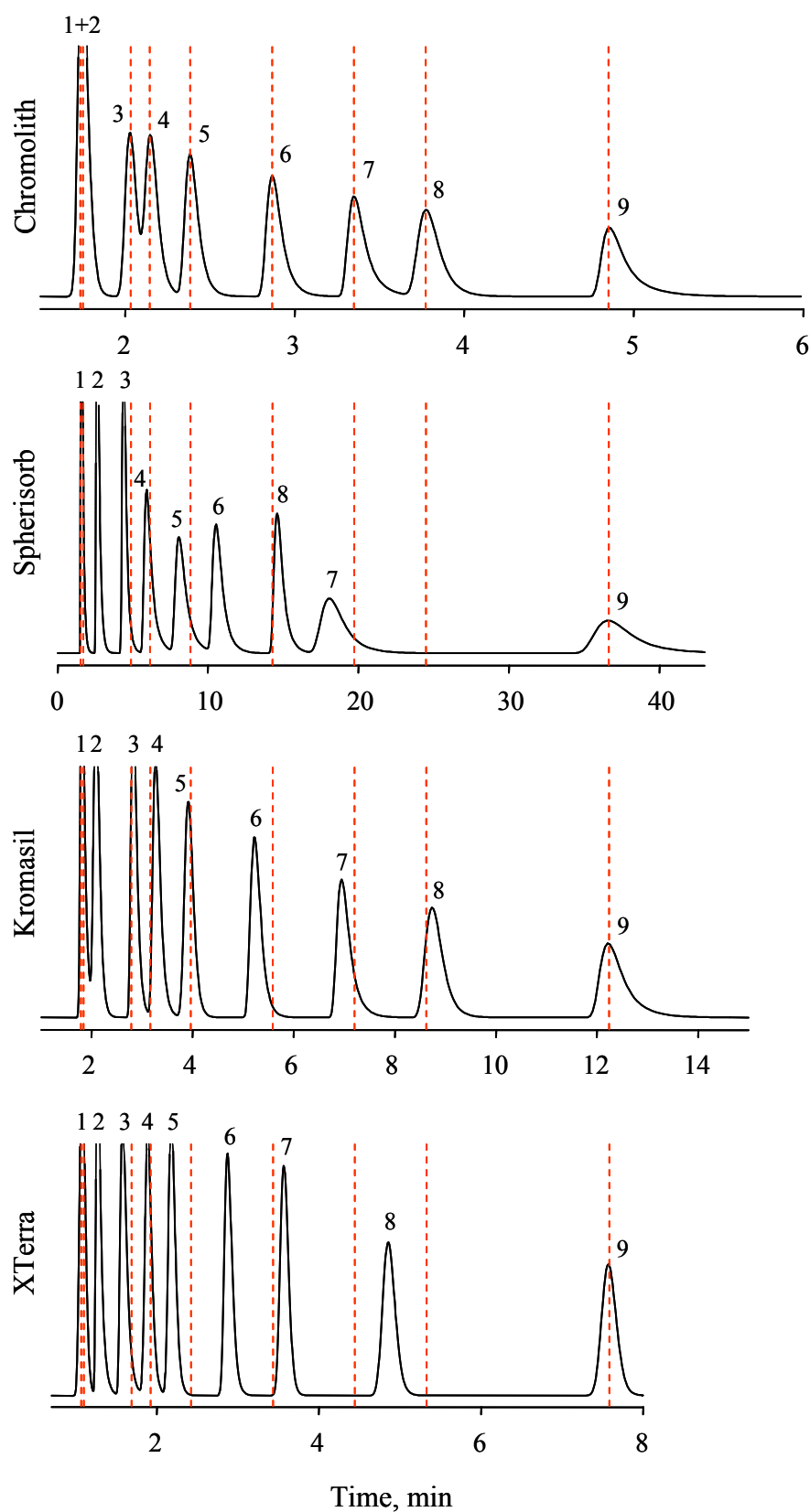


**Figure 3.** Chromatograms of a mixture of nine  $\beta$ -blockers eluted with 15% acetonitrile using different columns. Compounds: (1) atenolol, (2) carteolol, (3) pindolol, (4) acebutolol, (5) metoprolol, (6) esmolol, (7) oxprenolol, (8) labetalol, and (9) propranolol.



**Figure 4.** Chromatograms of a mixture of nine  $\beta$ -blockers eluted with 20% acetonitrile using different columns. See Fig. 3 for peak identification.



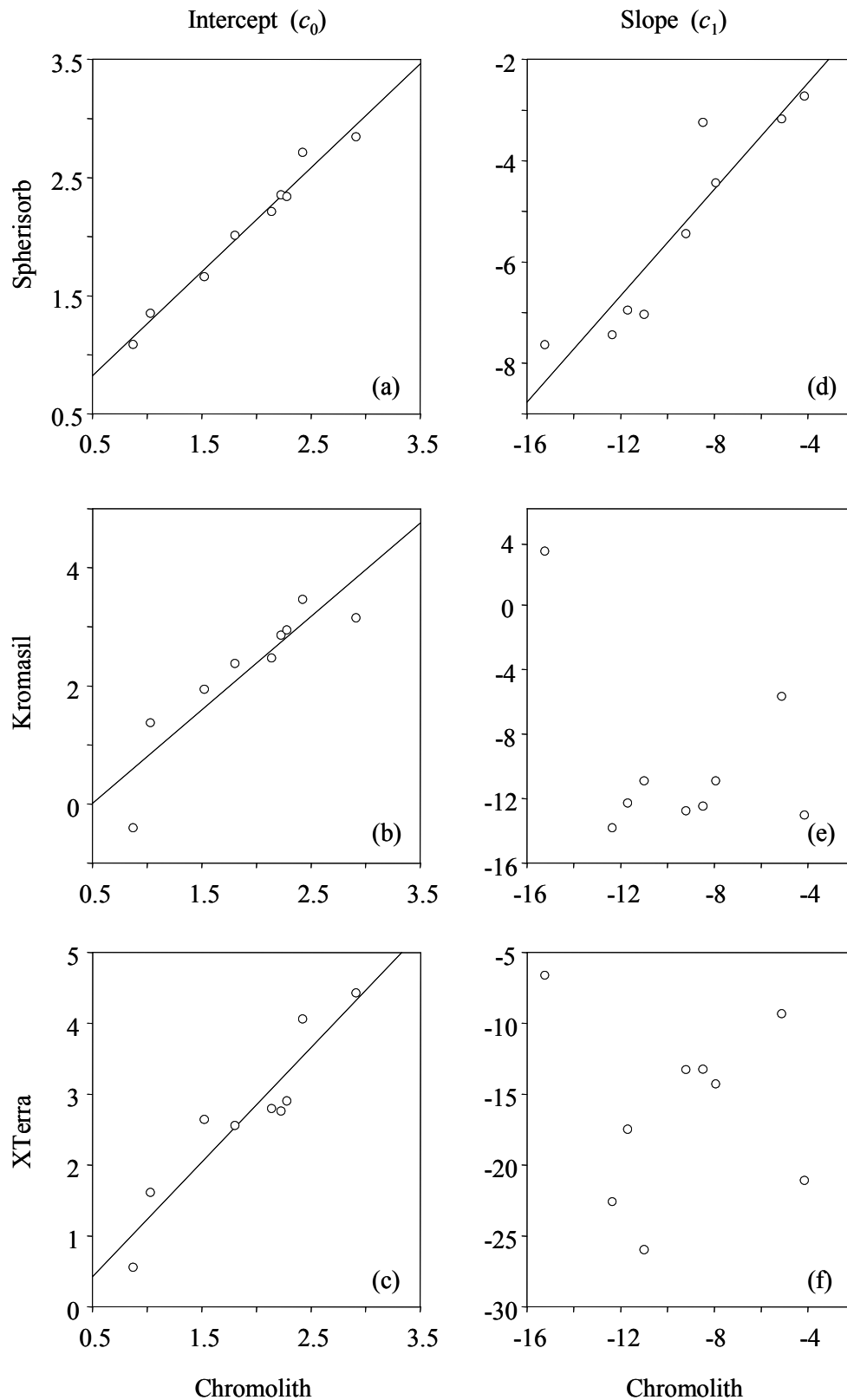


**Figure 5.** Chromatograms of a mixture of nine  $\beta$ -blockers eluted with 25% acetonitrile using different columns. See Fig. 3 for peak identification.

We also compared the retention capability of the different columns, based on the retention models. Fig. 6 compares the coefficients  $c_0$  in Eq. (1) (which coincides with the  $\log k$  value in pure water), and  $c_1$  (which has been named “the elution strength parameter”) for the set of  $\beta$ -blockers, separated with the Chromolith column versus the Spherisorb, Kromasil and XTerra columns. Surprisingly, the best correlations were established between the Chromolith and Spherisorb columns (although the change in elution order for oxprenolol and labetalol should be noted). Rough  $c_0$  correlations were found for the pairs Chromolith/Kromasil and Chromolith/XTerra. The correlation for the  $c_{11}$  values (not shown), which is associated to the deviation of the  $\log k$  versus  $\varphi$  relationship from linearity, was also good for Chromolith/Spherisorb, and poor for Chromolith/Kromasil and Chromolith/XTerra.

### **3.4. Column transfer**

The transfer from a microparticulate C18 column to Chromoliths results in a gain in time. For some columns, this is true even at the pre-established low flow-rate (compare the behaviours of the Chromolith and Spherisorb columns in Fig. 1), but the greater benefit with the Chromolith is achieved regarding the possibility of increasing the flow-rate at high values. The interest in investigating whether separations developed on conventional C18 columns can be transferred to Chromoliths is, thus, not surprising [18,20,29–32]. However, even different microparticulate columns not always result in similar elution strength and selectivity among them. Therefore, the transfer of separations from one column to another is not always successful. In an interesting study [30], six methods developed on conventional microparticulate C8 and C18 columns for the analysis of an alkylbenzene mixture, drugs and their impurities, and a green tea extract, were transferred to Chromolith Performance and Chromolith SpeedROD columns. The transferred methods succeeded only for three of the six methods.

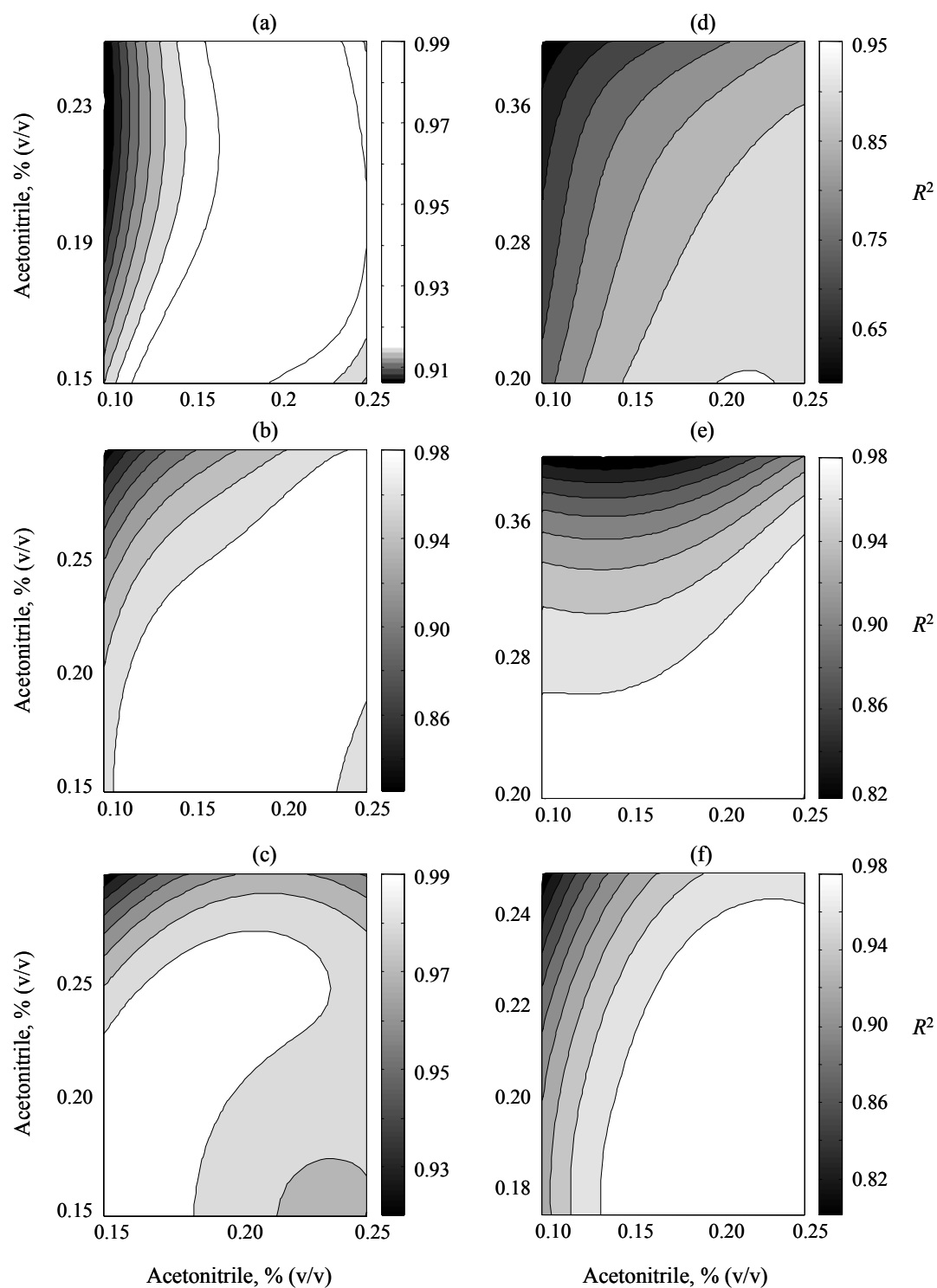


**Figure 6.** Correlations between the  $c_0$  and  $c_1$  coefficients in Eq. (1) for Chromolith versus: (a) Spherisorb, (b) Kromasil, and (c) XTerra.

As commented, in the literature, the comparison between columns in terms of selectivity is usually made at specific mobile phase compositions. In this work, our purpose is extending these studies to a wide range of compositions. We found that the analysis times for the mixture of  $\beta$ -blockers, separated with the Chromolith and XTerra columns, were similar in the whole experimental domain (Fig. 1, Section 3.2). This facilitated the direct comparison of chromatograms, as shown in Section 3.3. In contrast, the Spherisorb column was more retentive for the assayed compounds. The analysis times for this column using 25 and 30% acetonitrile were similar to those for the Chromolith Performance using 15 and 20% acetonitrile (compare the corresponding chromatograms in Figs. 3 and 5). However, even considering the different elution strength, the selectivities for the Chromolith and Spherisorb columns appear different.

In view of these results, we decided to explore the whole experimental domain in detail to assess the similarity between columns. For this purpose, the retention times of the set of  $\beta$ -blockers separated with the Chromolith were regressed versus the retention times for each of the three microparticulate columns, at varying mobile phase composition. The retention times for each  $\beta$ -blocker were calculated according to Eq. (1) for 30–60 mobile phase compositions (depending on the column), evenly distributed in the solvent content range.

Fig. 7 depicts contour maps showing the  $R^2$  coefficients for the above correlations at varying mobile phase composition. As observed, the pair Chromolith/XTerra showed the largest similarity (with maximal  $R^2 = 0.99$ ) in a wide range of compositions (Fig. 7a). The maximal similarities for Chromolith/Kromasil (Fig. 7b) was  $R^2 = 0.98$ , being appreciably smaller for Chromolith/Spherisorb (Fig. 7d) with  $R^2 = 0.95$  in a narrow region. The smaller  $R^2$  value for the Spherisorb column can be at least partially explained by the change in elution order for oxprenolol and labetalol. After eliminating labetalol from the mixture (Fig. 7e), the similarity expressed as  $R^2$  increased to 0.98. On the other hand, Fig. 7c shows that the similarity between the Kromasil and XTerra columns is larger than between the Chromolith and Kromasil columns ( $R^2 = 0.99$  versus 0.98).



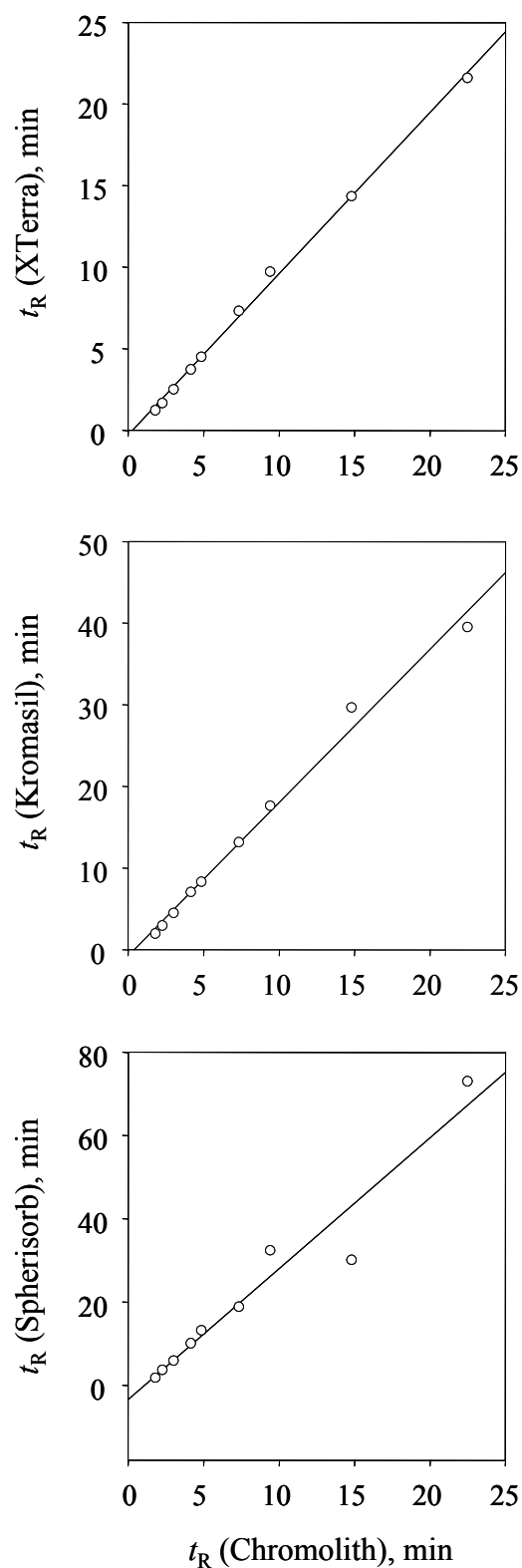
**Figure 7.** Similarities in selectivity between columns, expressed as the  $R^2$  coefficients for the correlations of the retention times of the nine  $\beta$ -blockers (those in Fig. 3) separated in a pair of columns, at varying mobile phase composition. Columns: (a) Chromolith/XTerra, (b) Chromolith/Kromasil, (c) Kromasil/XTerra, (d) Chromolith/Spherisorb, (e) Chromolith/Spherisorb (without labetalol), (f) Chromolith/Spherisorb (both in the presence of 0.1% TEA).

These results show that an appropriate transfer of the results to the Chromolith Performance RP-18e column is possible for the XTerra and Kromasil columns, especially for the former, and this is true in a wide range of mobile phase compositions. Figs. 8a–c depict the correlations between the retention times in different pairs of columns for a mobile phase in the region of maximal similarity for each pair.

### **3.5. Peak shape**

Many drugs and biomedically important compounds are bases, and their chromatographic analysis is usually troublesome, due to the ion-exchange interactions of the positively charged solutes in acidic medium with residual ionised silanol groups on the surface of conventional silica-based phases. This results in severe peak tailing and low column efficiency. Residual silanols are the consequence of incomplete bonding coverage of the packing material. Metal impurities embedded in the silica substrate can strongly enhance silanol acidity, and thus increase the undesirable interactions with the basic analytes. Another important factor is the accessibility to the corresponding sites. This topic, together with the approaches proposed to improve the chromatographic performance of bases, has been extensively studied and reviewed in the literature [44–53].

A considerable improvement in the analysis of basic compounds by RPLC was achieved by the development of high purity silica substrates (type-B silica with low metal contents). Several strategies have been also developed to decrease the number of residual silanols on the silica surface. The most common process is column endcapping, which does not completely remove the silanols. In order to reduce the accessibility to free silanols, new packings with specially designed groups (bulky, bidentate, polymeric-coated) have been developed [52]. One example is the XTerra MS C18 column. The negative charge (i.e. increased silanol ionisation) is larger on the type-A than on the type-B columns, at least below  $\text{pH} = 7$ . However, the behaviours vary over wide limits [53].



**Figure 8.** Correlation of the retention times for the nine  $\beta$ -blockers (those in Fig. 3) in a pair of columns, using a mobile phase in the region showing maximal similarity between columns (see Fig. 7). The mobile phase composition was 18% acetonitrile for Chromolith, Kromasil and XTerra, and 20% for Spherisorb.

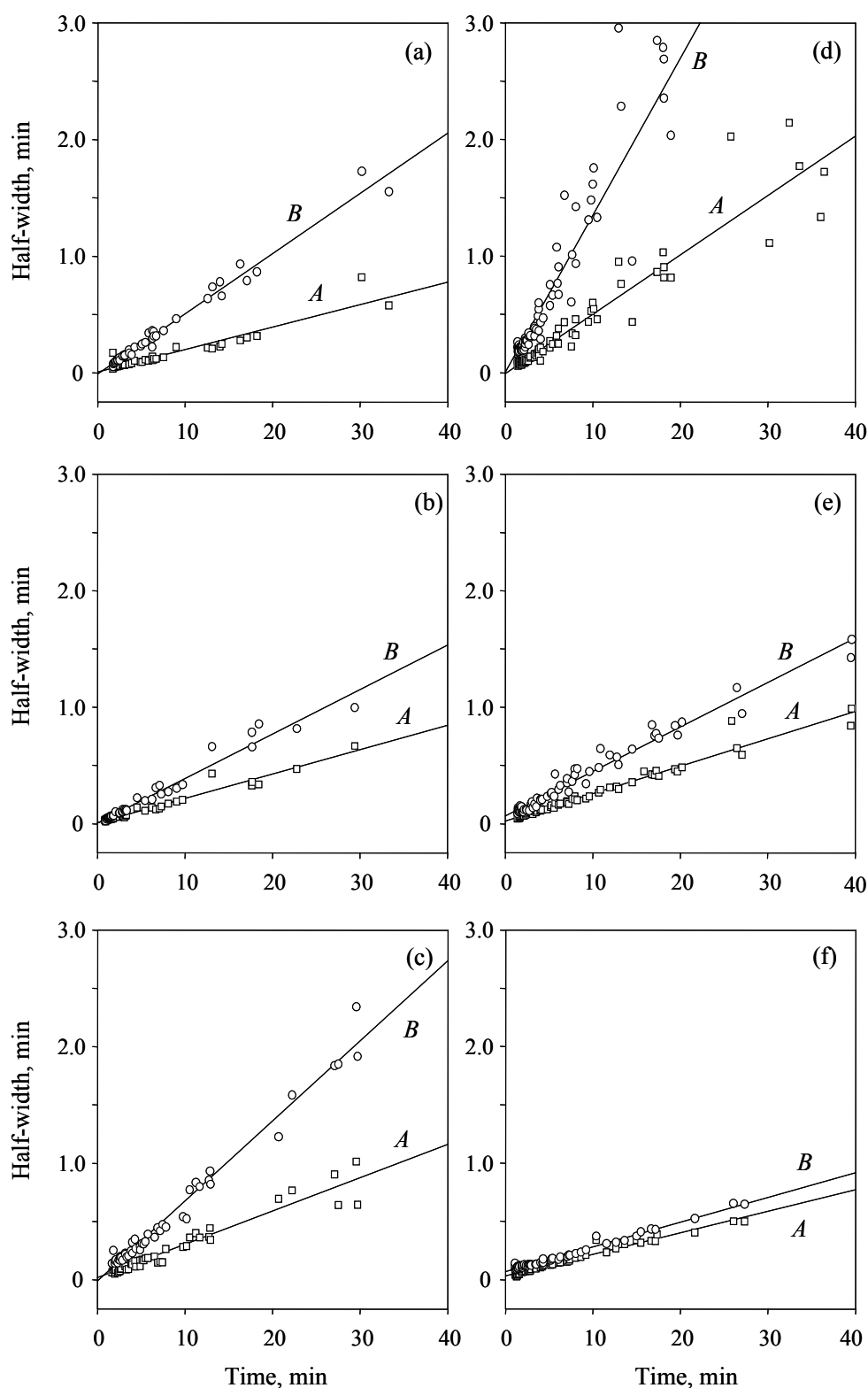
The combination of the relatively large sizes of the macropores in Chromoliths compared to that of mesopores gives rise to peak efficiencies comparable to those for microparticulate columns of type B with 3–5  $\mu\text{m}$  spherical particles. On the other hand, compounds that tail on type-B columns have been found to tail also on Chromoliths [31,55], but the tailing factors for the latter have been reported to be higher with regard to packed columns for acidic, basic, and even neutral compounds [2,51]. This has been explained by the column-bed radial heterogeneity and/or slow mass transfer kinetics [21]. The advantage of the Chromoliths has been suggested to be somewhat less for basic compounds, based on the peak shapes obtained for a number of bases (pyridine, 4-ethylaniline, aniline, quinine and nortriptyline), separated in different RP-18e columns: Chromolith, Inertsil ODS-3, SymmetryShield, and Purospher Star, all of them 100 $\times$ 4.6 mm in dimensions [55].

The efficiencies and asymmetries of particular compounds are often examined to assess the performance of chromatographic columns. In one of such reports, the peak shape features of two antibiotics (ciprofloxacin and vancomycin), chromatographed in several columns including a Chromolith SpeedROD RP-18e, were compared in a wide range of mobile phase composition [56]. In order to evaluate the column efficiencies and peak tailing, we measured instead the left (*A*) and right (*B*) peak half-widths at 10% height. Figs. 9a,cd,f plot *A* and *B* versus the retention times for the ten  $\beta$ -blockers separated with the four columns, considering the whole range of mobile phase compositions. As observed, there is an approximately linear relationship between the peak half-widths and the retention time:

$$A = c_{0,A} + c_{1,A} t_R \quad (3)$$

$$B = c_{0,B} + c_{1,B} t_R \quad (4)$$





**Figure 9.** Correlation of the left (*A*) and right (*B*) peak half-widths with the retention time for the  $\beta$ -blockers, separated in: (a) Chromolith without TEA, (b) Chromolith with TEA, (c) Kromasil, (d) Spherisorb without TEA, (e) Spherisorb with TEA, (f) XTerra. Peaks obtained throughout the whole experimental design were considered for each column.

The coefficients in Eqs. (3) and (4) for the four columns are shown in Table 3. It should be noted that the measurement of peak half-widths involves a certain level of uncertainty, especially for the most apolar compounds (e.g. labetalol and propranolol in the  $\beta$ -blockers set), which show highly distorted peaks in some conditions. For such peaks, it is not easy to delimit the peak time domain. The measurement of peak half-widths was especially troublesome for the Spherisorb column. This may explain, at least partially, the scattering in the plots in Fig. 9 (see also the regression coefficients,  $R$ , in Table 3). For this reason, the data for the Spherisorb column were not included in the following discussion.

As expressed in Eqs. (3) and (4), the peak half-width depend almost linearly on the retention time of solutes, which in turn, are related to the mobile phase composition through Eq. (1) (with particular coefficients for each solute). The correlation between half-widths and retention times is practical to predict (at least approximately) the peak shape (asymmetry,  $B/A$ , and efficiency,  $N$  [57]):

$$N = \frac{41.7 \left( \frac{t_R}{A+B} \right)^2}{1.25 + \frac{B}{A}} \quad (5)$$

for individual compounds eluted at a given mobile phase composition, and has been applied with success for optimisation purposes in microparticulate columns [58].

The slopes  $c_{1,A}$  and  $c_{1,B}$  in Eqs. (3) and (4) (see Fig. 9 and Table 3) offer information about the peak shape general behaviour of the columns: the sum of the slopes is related to the column efficiency, whereas their ratio ( $c_{1,B}/c_{1,A}$ ) is a global measurement of the peak asymmetry. Leaving aside the Spherisorb column, Kromasil showed the poorest efficiency, followed by Chromolith and XTerra. On the other hand, the larger slope for  $B$  indicates the tailing character of the peaks in all columns. The asymmetry rank was the following ( $c_{1,B}/c_{1,A}$  values are given): Chromolith (2.65), Kromasil (1.97), and XTerra (1.24).

**Table 3.** Correlation parameters of the left ( $A$ ) and right ( $B$ ) half-widths with the retention time for the ten  $\beta$ -blockers.<sup>a</sup>

Column	$c_{0,A}$	$c_{1,A}$	$R_A$	$c_{0,B}$	$c_{1,B}$	$R_B$
Chromolith RP-18e	-0.004	0.020	0.982	-0.027	0.053	0.997
Chromolith RP-18e with TEA	0.004	0.022	0.983	-0.009	0.041	0.993
Spherisorb ODS-2	-0.057	0.059	0.975	0.237	0.097	0.889
Spherisorb ODS-2 with TEA	0.023	0.023	0.983	0.056	0.042	0.944
Kromasil C18	-0.052	0.039	0.957	-0.070	0.077	0.990
XTerra MS C18	0.024	0.021	0.954	0.052	0.026	0.952

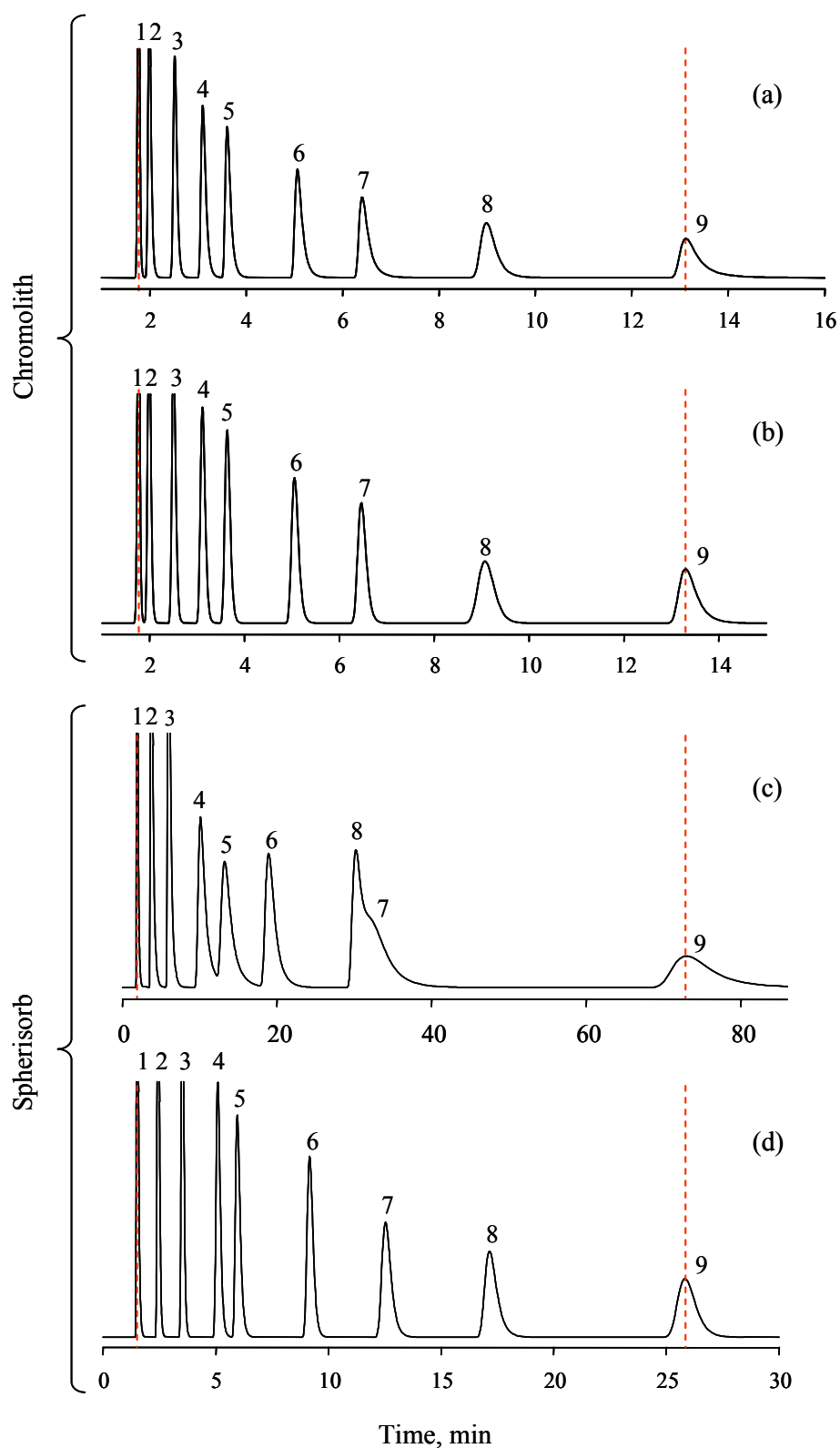
<sup>a</sup>  $c_{0,A}$ ,  $c_{1,A}$ ,  $c_{0,B}$ , and  $c_{1,B}$  are the regressed coefficients in Eqs. (3) and (4), and  $R_A$  and  $R_B$  are the corresponding correlation coefficients.

As commented, the reason for the tailing character of the peaks in silica-based columns is the interaction of the basic analytes with ionised silanols, whose acidity depends on the metal impurities in the silica [39,40,53]. In order to avoid this effect, it is common use to work at low pH (in this work, the mobile phase was buffered at pH = 3.0). Since this is not sufficiently effective in many cases, another common approach is to add amine counterions to the eluent as silanol blockers, triethylamine (TEA) being one of the most common [50,59]. Thus, a slight improvement in the peak symmetry was reported for a basic compound, vancomycin, using a Chromolith SpeedROD RP-18e column by addition of TEA [59].

We developed again the experimental designs for the Chromolith and Spherisorb columns, in the ranges 10–25% and 15–25% acetonitrile, respectively, in the presence of 0.1% TEA. Fig. 10 shows chromatograms obtained with a mobile phase containing 20% acetonitrile and 0.1% TEA, for the two columns. As observed, the addition of TEA yielded an important reduction of the retention times with the Spherisorb column (Fig. 10c,d, see also Fig. 1), whereas the change in retention was minimal with the Chromolith column. This agrees with a previous observation that in contrast to type-A silica-based phases, the amine blocker does not have a large effect on the retention of basic compounds with the newer type-B silica-based materials [50].

In contrast, the addition of TEA produced benefits with regard to the improvement in peak shape for both columns (Chromolith and Spherisorb), but the most significant result is that both the column efficiency, characterised by the sum of  $c_{1,A}$  and  $c_{1,B}$ , and the column asymmetry, measured as  $c_{1,B}/c_{1,A}$  became similar upon the addition of TEA (0.063 versus 0.065, and 1.86 versus 1.83, respectively, see also Figs. 9b,e). This means that the silanol activity for both columns becomes closer in the presence of TEA. Observe that the values for the other columns are different.

There is another interesting result regarding both columns (Chromolith and Spherisorb): the similarity in the selectivities along the whole experimental domains is enhanced significantly upon addition of TEA (compare Figs. 7d and f). On the other hand, the correlations between the parameters of the retention model in both columns (Eq. (1)), which were noteworthy in the absence of TEA (see Figs. 6a and d and discussion in Section 3.3), was lost with TEA.



**Figure 10.** Chromatograms of a mixture of nine  $\beta$ -blockers obtained with: (a,b) Chromolith, and (c,d) Spherisorb, using 20% acetonitrile mobile phases without TEA (a,c), and in the presence of 0.1% TEA (b,d). See Fig. 3 for peak identification.

### 3.6. Resolution

The chromatographer is interested in achieving good resolution (in sufficiently short analysis times), which depends on the selectivity and peak shape. In order to measure (and optimise) the resolution, we used the peak purity concept, which quantifies the peak area percentage free of interference [60]:

$$p_i = 1 - \frac{o_i'}{o_i} \quad (6)$$

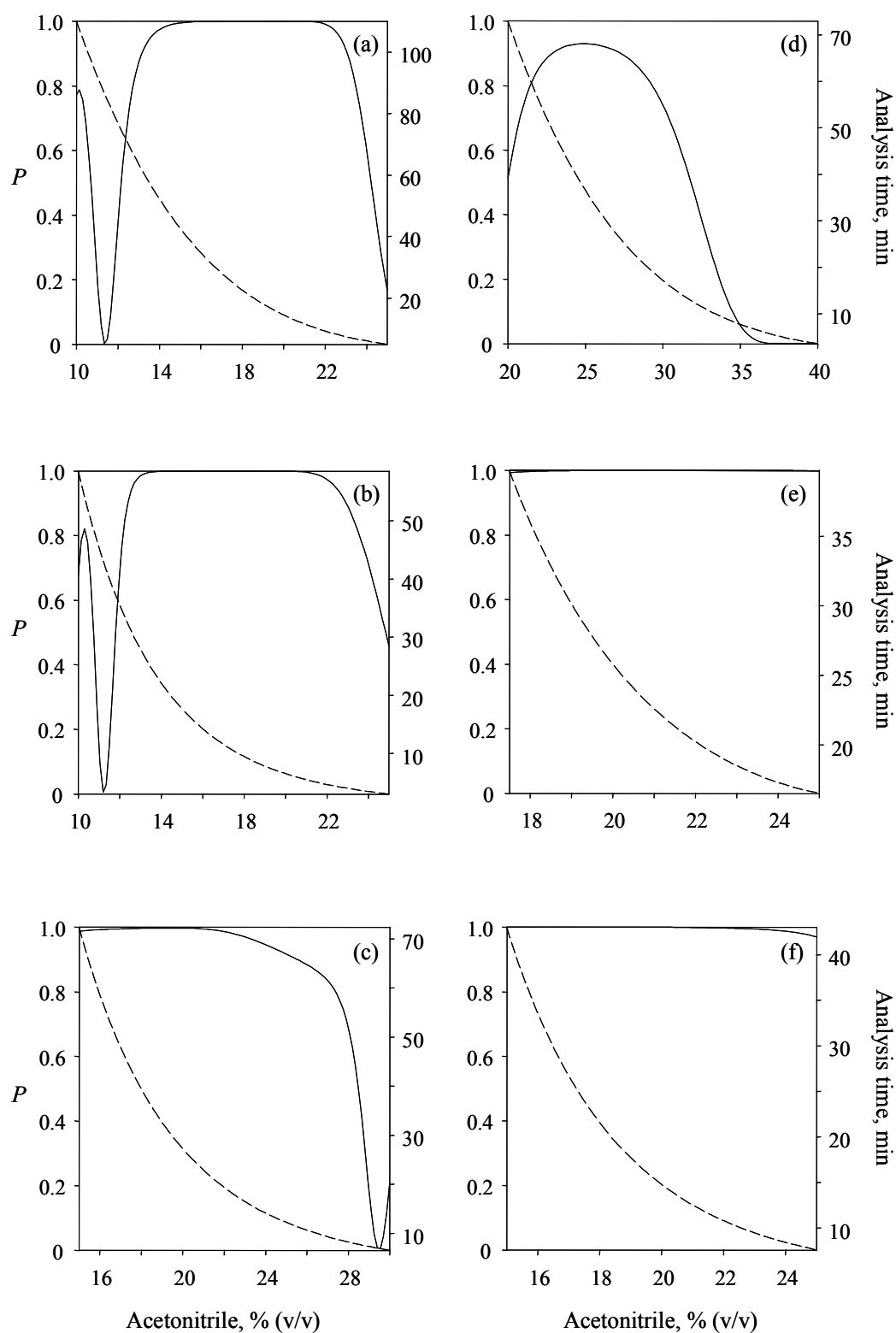
where  $o_i'$  is the area under the peak overlapped by a hypothetical chromatogram built with the peaks of the remaining compounds in the mixture, and  $o_i$  the total area of the peak of interest. The peak purity is an objective function that takes into account the selectivity (i.e. peak distribution), peak shape (efficiency and asymmetry), and peak size (related to the solute concentrations and instrumental responses). Peak purities range from zero for full overlapping to one for full resolution.

The global separation in the chromatograms was evaluated by combining the elementary peak purities as follows:

$$P = \prod_{i=1}^n p_i \quad (7)$$

where  $n$  represents the number of peaks [61].

Fig. 11 depicts the resolution diagrams (full lines) for the separation of the nine  $\beta$ -blockers in the whole experimental domains for the four columns (the analysis times are overlapped, dotted lines). As already observed in Figs. 3–5, the  $\beta$ -blockers exhibited good resolution in a wide range of compositions, with the Spherisorb column presenting the most critical situation, followed by the Kromasil column. The resolution was complete ( $P = 1$ ) in the whole range of working conditions for the Spherisorb column in the presence of TEA (Fig. 11e), and almost complete for the XTerra column (Fig. 11f).



**Figure 11.** Resolution diagrams (full lines) and analysis times (dotted lines) for a mixture of nine  $\beta$ -blockers (those in Fig. 3). Columns: (a) Chromolith without TEA, (b) Chromolith with TEA, (c) Kromasil, (d) Spherisorb without TEA, (e) Spherisorb with TEA, and (f) XTerra.

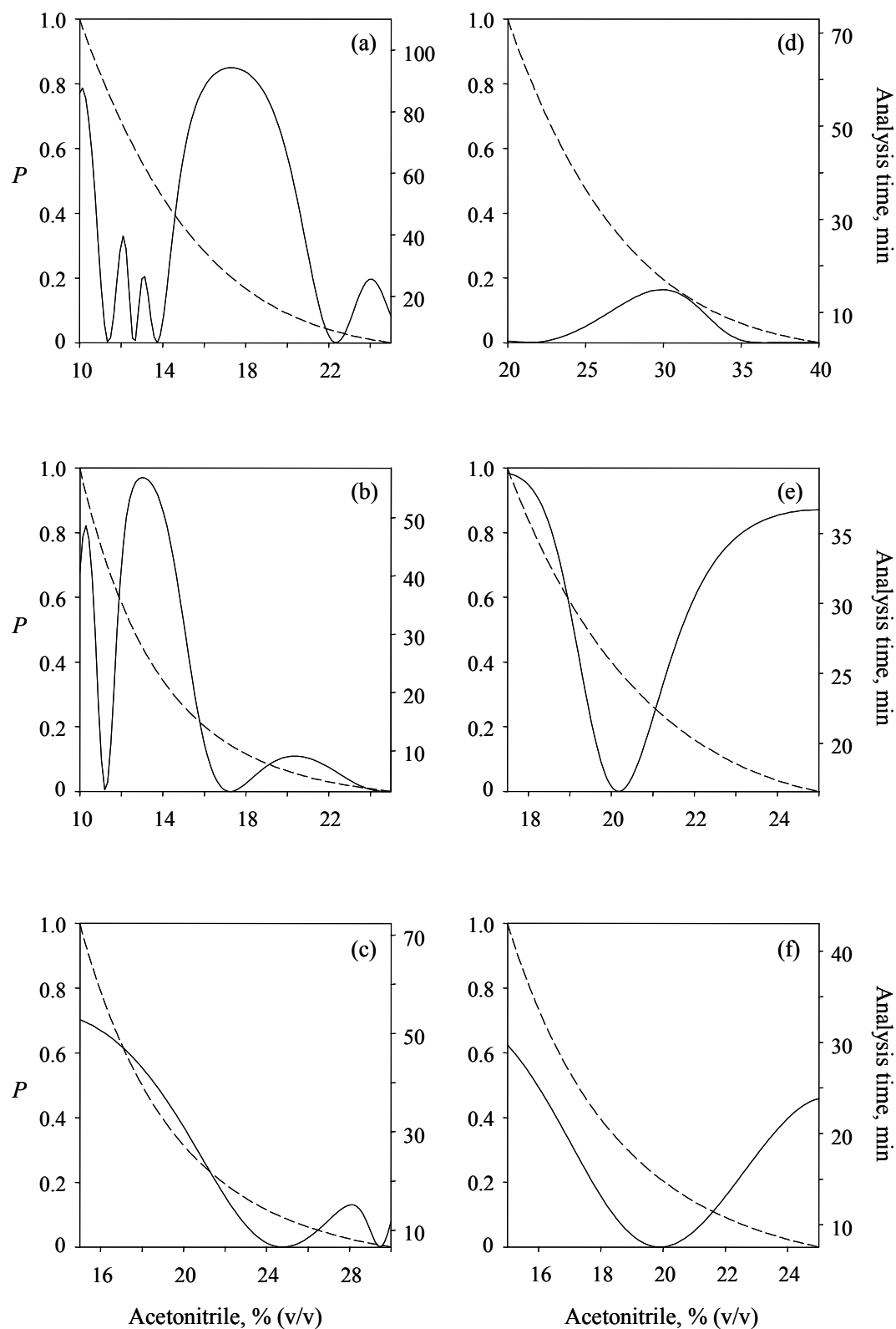
Fig. 12 shows the resolution diagrams for a more complex mixture that includes timolol, which as commented overlaps critically with acebutolol and metoprolol. Without TEA, only the Chromolith column was able to resolve (and only partially) the critical peaks, the maximal resolution being extremely poor for the other columns. Meanwhile, in the presence of TEA, both Chromolith and Spherisorb succeeded in the separation of the critical pairs at low acetonitrile content, being the analysis time of the mixture of ten  $\beta$ -blockers somewhat shorter for the former column (below 30 min).

Fig. 13 illustrates the situation by depicting, for the optimal mobile phase compositions, the section in the chromatograms where the three critical peaks elute. It can be observed that without TEA the columns exhibited different elution orders (only the same for the Kromasil and XTerra columns). However, when TEA was added, the elution order for the Chromolith and Spherisorb columns was the same, and different from that found for these columns in the absence of TEA (i.e. the selectivities for the critical peaks became again similar).

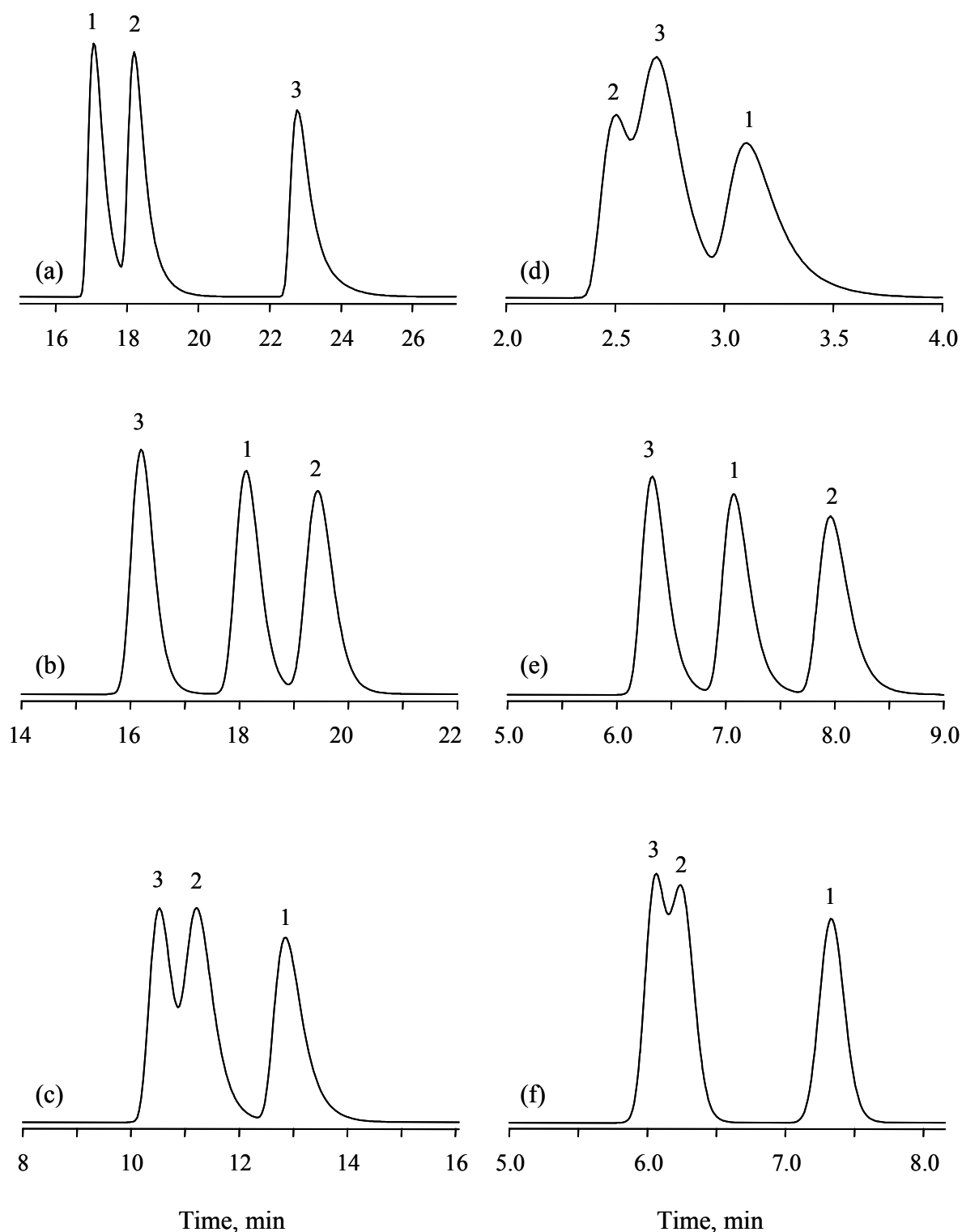
#### **4. Conclusions**

Numerous reports have been published, where the performance of Chromolith columns are compared with one or more microparticulate columns of the same type, but different manufacturer. These comparisons are made usually at only one or at a few mobile phase compositions. In some cases, some similarities in selectivity have been observed among the columns. In other cases, the columns seemed to behave different. However, the similarities may depend on the mobile phase composition. For this reason, in this work, the comparisons between columns were extended to a range of compositions. The quadratic  $\log k$  versus  $\phi$  model, which yields accurate predictions, facilitated the study. This model can be fitted using the retention data associated to 3–4 mobile phase compositions, and allows accurate predictions in a wide range of compositions.





**Figure 12.** Resolution diagrams (full lines) and analysis times (dotted lines) for a mixture of the ten  $\beta$ -blockers (including timolol). Columns: (a) Chromolith without TEA, (b) Chromolith with TEA, (c) Kromasil, (d) Spherisorb without TEA, (e) Spherisorb with TEA, and (f) XTerra.



**Figure 13.** Optimal chromatograms for a mixture of: (1) metoprolol, (2) acebutolol, and (3) timolol, obtained with: (a) Chromolith without TEA and 10% acetonitrile ( $P = 0.895$ ), (b) Chromolith with TEA and 10% acetonitrile ( $P = 0.981$ ), (c) Kromasil and 15% acetonitrile ( $P = 0.703$ ), (d) Spherisorb without TEA and 35.8% acetonitrile ( $P = 0.392$ ), (e) Spherisorb with TEA 17.5% acetonitrile ( $P = 0.983$ ), and (f) XTerra and 15% acetonitrile ( $P = 0.626$ ).

There are a wide range of silica-based packed columns available in the market. Leaving aside the possibility of working at high flow-rate, previous work show the Chromolith column as only one column more, with no more difference between the retention patterns with regard to a packed column, than between two packed columns of different brands. In this work, the Chromolith column was compared with three packed columns manufactured with different types of silica: Spherisorb (type-A silica), Kromasil (type B) and XTerra (type B combined with methylsilane).

We were interested in examining the performance of the Chromolith column for a specific group of compounds (several  $\beta$ -blockers), and made a comprehensive comparison, including all the relevant chromatographic features: analysis time, selectivity, peak shape (efficiency and asymmetry) and resolution. The study showed that the Chromolith column has favourable features with regard to the other columns in the analysis of  $\beta$ -blockers, which are typical basic drugs. This conclusion contrasts with previous comments on the inadequacy of Chromoliths to analyse basic compounds [55].

We observed that the Chromolith column behaved similarly to the XTerra column in terms of analysis time and selectivity, in a wide range of mobile phase compositions, although the peak shape was improved with the XTerra column (at  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ). Although in a lesser extent, the selectivities for the Chromolith and Kromasil columns were also similar, but with longer analysis times for the latter. Surprisingly, the Spherisorb column (which is manufactured with a type-A silica) showed the same elution strength pattern as the Chromolith column (although completely different selectivity). Also, when 0.1% TEA was added to both Chromolith and Spherisorb columns, the peak shapes and selectivities, which differed significantly without TEA, became similar. This may indicate that the same blocking degree of silanol groups is achieved for both columns with TEA.

The great advantage of Chromoliths of allowing high flow-rates with low backpressure should not be overlooked. However, the commercialisation of silica-based monolithic columns of different brands as is the case of the hundreds of packed columns in the market is needed to encourage the use of the monolithic columns.

## References

1. K. Cabrera, D. Lubda, H.M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, J. High Resol. Chromatogr. 23 (2000) 93.
2. N. Wu, J. Dempsey, P.M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvratt, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 149.
3. A. Detroyer, Y. Vander-Heyden, K. Reynaert, D.L. Massart, Anal. Chem. 76 (2004) 1903.
4. C. Legido-Quigley, N.W. Smith, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 61.
5. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, J. Chromatogr. A 1036 (2004) 127.
6. D.B. Gomis, N.S. Núñez, M.D. Gutiérrez-Álvarez, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 29 (2006) 931.
7. T. Yoshida R.E. Majors, J. Separ. Sc. 29 (2006) 2421.
8. D. Guillarme, D.T.T. Nguyen, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (2008) 430.
9. H.A. Naeem, H.D. Sapirstein, J. Cereal Sc. 46 (2007) 157.
10. X. Yang, L. Ma, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1079 (2005) 213.
11. N. Wu, A.M. Clausen, J. Separ. Sc. 30 (2007) 1167.
12. F. Svec, C.G. Huber, Anal. Chem. 78 (2006) 2100.
13. B.A. Olsen, B.C. Castle, D.P. Myers, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 796.
14. N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, J. Chromatogr. A 965 (2002) 35.
15. A.M. Siouffi, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 86.
16. K. Mistry, N. Grinberg, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 28 (2005) 1055.
17. K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Soga, N. Tanaka, J. Sol-Gel Sci. Technol. 13 (1998) 163.
18. D. Lubda, K. Cabrera, W. Kraas, C. Shaefer, D. Cunningham, LC-GC 19 (2001) 1186.
19. H. Tanaka, N. Ishizuka, K. Hosoya, K. Kimata, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, Kuromatogurafi 14 (1993) 50.
20. K. Cabrera, J. Sep. Sci. 27 (2004) 843.
21. K. Miyabe, G. Guiochon, J. Sep. Sci. 27 (2004) 853.

- 
22. S. Pous-Torres, J.R. Torres-Lapasió, M.J. Ruiz-Ángel, M.C. García-Álvarez-Coque, (unpublished results).
  23. B. Bidlingmaier, K.K. Unger, N. von Doehren, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 11.
  24. P. Zöllner, A. Leitner, D. Lubda, K. Cabrera, W. Lindner, *Chromatographia* 52 (2000) 818.
  25. G. Dear, R. Plumb, D. Mallett, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 152.
  26. L. Spoof, J. Meriluoto, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 237.
  27. F. Gritti, G. Guiochon, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5726.
  28. F.C. Leinweber, U. Tallarek, *J. Chromatogr. A* 1006 (2003) 207.
  29. J.H. Smith, H.M. McNair, *J. Chromatogr. Sci.* 41 (2003) 209.
  30. A.M. van Nederkassel, A. Aerts, A. Dierick, D.L. Massart, Y. Vander-Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 233.
  31. Y. Chu, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 113.
  32. L. Nováková, L. Matysová, D. Solichová, M.A. Koupparis, P. Solich, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 191.
  33. M. Cledera-Castro, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 57.
  34. L. Urbánek, D. Solichová, B. Melichar, J. Dvořák, I. Svobodová, P. Solich, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 11.
  35. F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 53.
  36. F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* (2008) in press.
  37. The United States Pharmacopoeia, Rockville, MD, USA.
  38. J. Köhler, J.J. Kirkland, *J. Chromatogr.* 385 (1987) 125.
  39. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J Chromatogr A* 1000 (2003) 757.
  40. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, P.W. Carr, L.R. Snyder, *J Chromatogr A* 1026 (2004) 77.
  41. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, second ed., Wiley/Interscience, New York, 1997, pp. 178–182.
  42. J.M. Cruikshank, *β-Blockers in Clinical Practice*, Churchill-Livingstone, New York, 1994.
  43. A. Detroyer, Y. Vander-Heyden, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 211.
  44. M.A. Stadalius, J.S. Berus, L.R. Snyder, *LC-GC* 6 (1988) 494.
  45. M. Reta, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 121.

46. D.V. McCalley, LC-GC 17 (1999) 440.
47. S.D. Rogers, J.G. Dorsey, J. Chromatogr. A 892 (2000) 57.
48. M.J. Ruiz-Ángel, J.R. Torres-Lapasió, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. Sc. 41 (2003) 350.
49. X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, Anal. Chem. 75 (2003) 3153.
50. D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 987 (2003) 17.
51. J.J. Kirkland, J. Chromatogr. A 1060 (2004) 9.
52. J.M. Herrero-Martínez, A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1060 (2004) 135.
53. M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, A. Berthod, J. Chromatogr. A 1119 (2006) 202.
54. D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 965 (2002) 51.
55. P. Forlay-Frick, Z.B. Nagy, H. Fekete, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 25 (2002) 1431.
56. J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 57 (1983) 730.
57. J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 17.
58. P. Forlay-Frick, J. Fekete, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 27 (2004) 123.
59. S.J. López-Grío, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 187.
60. S. Carda-Broch, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 396 (1999) 61.

## Conclusions

### C.1. Dead time estimation

#### *C.1.1. Dead time markers and the homologous series method*

- The main problem of direct methods for dead time estimation is the absence of ideal markers. All common markers are either slightly retained or partially excluded from the stationary phase. Moreover, the retention times depend on the separation conditions: a compound that is a good marker in some experimental conditions can be more or less retained in other conditions.
- An ideal unretained compound should be small enough to have full access to the whole available volume of the pores in the stationary phase, but hydrophilic enough to have negligible interactions with the bonded phase. Ion-exchange processes should be inexistent. Compounds meeting all these conditions are not easy to find, since different small neutral molecules show retention times that decrease at increasing mobile phase hydrophobicity.
- The retention of 12 common markers in the 10–90% acetonitrile range showed that the change in retention time with the mobile phase composition was remarkable for three of them (2-nitrobenzoic, benzoic and picric acids), minor changes being observed for other three (dimethylformamide, acetone and floroglucinol). Only KBr, KI, tartrazine, thiourea, uracil and urea were truly unretained, although the dead time values showed small differences, which should be attributed to their different accessibility to the stationary phase pores, and the existence of residual interactions.
- On the other hand, the different results obtained with different homologous series rely mostly on the mathematical approach and the data quality, since the dead time is an extrapolated value. The problem arises from the large weight in the fitting given to the data for most retained compounds that act as leverage points.

- The sequential elimination of the highest homologous was checked to converge towards a consistent dead time estimation, when the maximal retention time was close to or below 5–6 min. We adopted the arbitrary criterion of averaging the estimations obtained for  $t_{R,max} \sim 2 t_0$  (the estimated dead time). The homologous series should contain at least four compounds with low retention. Otherwise, overestimations of dead time are yielded.
- A straightforward fitting of Eq. (2.8) (Chapter 2) (obtained from the linear fitting of  $\log k$  versus the organic solvent content), carried out individually for each nitrosamine, yielded dead time estimations that depended strongly on the particular compound. This behaviour should be interpreted, at least partially, as due to the diverse range of retention for each compound and the insufficient accuracy in the measurement of retention times (and organic solvent content).
- The results suggest that the simultaneous treatment of all available information (the data from several compounds and mobile phase compositions) should be beneficial to estimate the dead time.

### ***C.1.2. Alternating iterative regression method using data from experimental designs***

- Dead time values estimated from Eq. (3.7) (Chapter 3), applied individually to each solute, were found too variable to be useful in practice. On the one hand, the results were severely affected by the magnitude of the retention times being processed, and on the other, they were too sensitive to minor deviations. Each solute converged to a different  $t_0$  value, which correlated positively with solute polarity. Such results illustrate why this method has not been recommended for dead time estimation.
- The proposed alternating iterative regression method is based on a subjacent relationship between the retention factor of retained compounds and the mobile phase composition. The algorithm is aimed to find a common  $t_0$  value, able to predict with the maximal accuracy the retention times of the compounds at each experimental condition. The method allows the simultaneous use of the



information provided by several compounds at diverse mobile phase composition, compensating the lack of accuracy or inadequacy of some data, which increases the reliability of the dead time estimation.

- The inclusion of slow solutes (i.e. involving retention times far from  $t_0$ ) usually gave rise to overestimations of the dead time. The reason is that the approach is based on extrapolations, and inaccuracies in data located far from the intercept, which act as leverage points, influence strongly the fitting and bias the results. As commented, the homologous series method suffers a similar drawback.
- The results gained coherence by eliminating sequentially the longest retention times. Along the cycles, the estimated  $t_0$  usually (but not always) decreased, and finally tended to stabilise. This elimination process can be subsequently applied whenever enough data remain for performing the regressions: the retention times for at least three mobile phases for each compound. As the information is gradually impoverished, owing to the loss of data produced by the elimination, a strong final drop is observed in the estimated  $t_0$ . This pattern informs that no further data must be removed, and that previous risky results should be discarded for the average. If initially the retention time matrix included inappropriate values, the sequential elimination of the longest retention times will grant convergence in consistent results.
- The final dead time was obtained by averaging those estimations fulfilling the condition  $t_{R,\max} \leq 2t_0$ , but when  $t_{R,\max}$  in the last iteration was  $> 2t_0$ , the results from the last five iterations were averaged. These decisions were taken arbitrarily after inspecting the convergence patterns that were obtained in a large number of cases.
- The proposed approach is implicitly assuming that the estimated void volume is the space accessible to solutes during their chromatographic elution, that the accessibility to the stationary phase pores of each solute in the set is similar, and that the dead volume is negligibly affected by changes in mobile phase composition.
- Ideally, the proposed method works the best in relatively narrow ranges of organic solvent concentration, where the linear approximation (Eq. (3.4) in Chapter 3) is best suited. This also grants minimal incidental variations in  $t_0$  with mobile phase composition. It should be noted that the sequential elimination of the longest

retention times also contributes to diminishing the impact of incidental changes in the solvation layer with mobile phase composition, and favours the fulfilment of the above conditions.

- The new method allows dead time estimation using the retention times of compounds taken in an optimisation experimental design framework or for other purposes, without the need of external compounds. No especial requirement is needed except that the compounds should not be excessively retained in the working conditions. In fact, the only need of the method is the availability of the retention times for two or more compounds (not excessively retained) at three or four mobile phase compositions.
- A comprehensive validation was carried out by comparing the results with those provided by the injection of unretained markers, the disturbance peak and the homologous series methods. It was also found that different groups of compounds yielded the same  $t_0$  value with the same column, which was verified in different organic solvent composition windows.

## C.2. Peak capacity estimation in isocratic elution

- Peak capacity is a useful concept as a descriptor of the column performance, but it is only accessible through calculation, since it is based on a situation rarely met in practice: a chromatogram with well distributed peaks that touch each other (i.e. resolved close to the baseline without gaps). In order to estimate the peak capacity, we decided to adopt a distance between consecutive peaks with  $R_S = 1.5$  (i.e.  $w = 6\sigma$ ), owing to the pseudo-exponential decrease close to the baseline that increases the probability of overlapping between adjacent non-Gaussian chromatographic peaks.
- The so called “intuitive method” estimates the peak capacity as the size of the chromatographic window measured in peak width units, assuming that all peaks have the same width. Since measuring the width of a number of peaks in a chromatogram is tedious, the peak capacity is very often estimated by averaging only a few width measurements.

- The assumption for the intuitive approach that all the peaks in the chromatogram have the same width contrasts with the methods proposed by Giddings and Grushka, where the width depends on the retention time although the efficiency ( $N$ ) is kept unchanged. However,  $N$  often tends to increase with the retention, and invariable  $N$  assumption for solutes having different retention may result in wrong peak capacity estimation. In fact, several modifications have been reported for the Grushka's approach to account for the changes in efficiency.
- Three approaches based on realistic descriptions of peak shape are here proposed. The first one is based on the Grushka's approach and considers the contributions of column and extra-column peak variances. The second approach relies on Giddings' and is able to assume asymmetrical peaks. The third approach, based on the intuitive approach, uses a mean peak width obtained by integration, instead of a mean value from several representative peaks.
- In the modified Giddings' approach proposed here, left ( $A$ ) and right ( $B$ ) peak half-widths (measured at 10% peak width to better account peak deformation) are assumed to depend linearly on retention time (which is a correct assumption in the ranges of organic solvent content usually considered in a chromatographic procedure).
- In RPLC with hydro-organic mobile phases, the slopes of the dependences between  $A$  and  $B$  and the retention time can be considered characteristic of a given column/solvent system at fixed temperature, provided the same solute set is used with approximately the same intrinsic efficiency and peak tailing for all compounds. Meanwhile, the intercepts in these dependences ( $A_0$  and  $B_0$ ) are related mainly to the extra-column contributions, and are progressively more significant for the narrower peaks appearing at the shorter retention times.
- The organic solvent is adsorbed on the stationary phase, which affects solute partitioning. Accordingly, some changes in the peak shape parameters ( $A$  and  $B$ ) were observed with mobile phase composition. This suggests that their measurement should be preferably done with a set of compounds eluted with a unique mobile phase. This is even more important with mobile phases containing a surfactant and an organic solvent, due to the modification of the thickness of the surfactant layer on the stationary phase, which changes the efficiency.

- The results of the three new approaches were contrasted with the classical Giddings' approach for ideal peaks, and a modification of the Grushka's approach that considers peak width changes measured at half-height. The real figures were obtained from synthetic chromatograms, built by adding real peaks from our data base.
- The modified Giddings' approach (Eq. (4.48)) offered prediction errors in the ranges  $-3.0$  to  $+4.4\%$  and  $-1.1$  to  $+0.8\%$  for the hydro-organic and micellar modes, respectively. In contrast, the classical approach (Eq. (4.39)), adapted in this work for  $R_s = 1.5$ , usually overestimated the number of peaks, with prediction errors in the ranges  $18.3$ – $33.8\%$  and  $6.7$ – $21.4\%$  for the hydro-organic and micellar modes, respectively.
- The modified Grushka's approaches developed for this work, based on Eq. (4.31) combined with Eqs. (4.33) or (4.34)), yielded prediction errors in the ranges  $0$  to  $+1.0\%$ , and  $-0.4$  to  $-3.6\%$ , respectively for the hydro-organic mode, and  $-2.0$  to  $+2.3\%$ , and  $+0.5$  to  $+3.3\%$ , respectively for the micellar mode.
- The modified intuitive approach based on mean peak widths (Eq. (4.56)) underestimated the number of peaks as a consequence of the larger weight given to wider peaks in the average.
- The results showed that the peak width (and not the skewness) is the relevant factor in the estimation of the peak capacity, at least in the studied examples. Nonetheless, the asymmetry could be a key factor in other situations (e.g. with highly distorted electrophoretical peaks).

### C.3. Chromatographic behaviour of ionisable compounds

#### C.3.1. Combined effect of solvent content, temperature and pH

- In the chromatographic analysis of ionisable compounds, the factor with the strongest effects on retention is the pH. Since the intrinsic retention of acidic and basic species ( $k_{\text{HA}}$  and  $k_{\text{A}}$ ) is different, sudden changes in retention happen when the pH in the mobile phase is close to the logarithm of the protonation constant ( $\log K$ ) of each compound. Also, ionisable compounds may exhibit large selectivity changes, owing to the interaction of organic solvent and/or temperature with pH.
- At increasing solvent content or temperature, the drop in retention with pH becomes smaller, whereas the jump width (i.e. in the direction of pH) keeps the same magnitude (ca. three pH units). Regions with too low elution strength associated to a low organic solvent content and/or temperature are risky under a practical point of view, due to the large changes in retention, combined with the usual uncertainties in the measurement of pH.
- A model containing eight parameters able to appraise the combined effect of organic solvent, temperature and pH on retention, and to estimate the solute protonation constants in the hydro-organic media at different temperature, was developed (Eq. (5.13) in Chapter 5). The model is theoretically supported, which prevents a too flexible fitting and decreases the influence of incidental outliers. This also confers a moderate capability to get information about the retention of the acidic and basic species, and extrapolate the retention behaviour in nearby regions out of the design. In this framework, empirical equations are unsuited, since they are only valid for narrow factor domains, being unable to exploit the benefits of the active use of three factors with significant mutual interactions.
- In the experimental practice, the use of the pH as a factor has the disadvantage that the same training design should satisfy the information requirements for several solutes with different protonation behaviour. This means that whereas the design can be appropriate for sampling the retention of some solutes, for others it can provide insufficient information for a proper fitting. In spite of this, the proposed

model offered accurate predictions, even for those compounds deficiently sampled by the experimental design.

- The number of parameters in the three-factor model is rather economic: in theory, eight “perfect” experiments would be enough for the fitting, although this would mean zero degrees of freedom and a larger influence of the outliers. However, due to the sudden drops in retention with pH and the need of sampling properly compounds of diverse acid-base behaviour, the number of experimental data needed to fit the retention models should be significantly larger than what could be expected from the number of coefficients in the retention model.
- The prediction accuracy of the three-factor model can be qualified as fully satisfactory for prediction tasks, as those needed in the optimisation of the resolution performance.
- The solvent content has a stronger effect on the acid-base behaviour than the temperature (at least in the studied ranges: 25–45% acetonitrile and 20–50°C), generally leading to increases in  $\log K$ , since the neutral species are more stable in less polar environments. The effect of temperature is far more variable. In some instances it induced only slight or uniform changes in  $\log K$ , but exceptionally, a change in the temperature gave rise to rather strong changes for some solutes.
- The most influent factor on the efficiency was the pH (detrimental), followed by the solvent content and temperature (both beneficial). Higher acetonitrile contents make the mobile phase more similar in polarity to the stationary phase and more fluid, which is the same effect produced at higher temperature. Thus, it is not surprising that the efficiency increased in both cases.
- The elution strength associated to the organic solvent content and temperature (measured by the parameters  $S_\phi$  and  $S_T$ , Eqs. (5.20) and (5.21) in Chapter 5) is positive, which indicates that increasing values of these factors will give rise to decreased retention. However, the strength of the organic solvent was always appreciably larger than that of temperature, at least in the experimental domain that could be covered with the instrument used in this work.

- The differential effect on selectivity is small for temperature, moderate for the organic solvent content and strong for pH. However, the effects of solvent content and temperature are magnified by the interaction with pH, since the solvent content and temperature influence the acid-base behaviour.
- These results suggest that the pH is the most interesting factor to control selectivity. However, it presents two disadvantages. First, for a given compound, the selectivity impact is restricted to the pH transition region (i.e. the region where its elution strength is strong), which is different for each compound. Secondly, the magnitude of the retention drops is so intense that the control of pH may be too critical for a practical use.

### ***C.3.2. Benefits of the simultaneous optimisation of the three factors***

- The results of the validation of the mechanistic model proposed in Chapter 5 suggested that it is able to be used in the prediction of retention for the optimisation of resolution, considering the three factors: organic solvent content, temperature and pH, and their mutual interactions.
- The selected set of ionisable compounds allowed testing an unfavourable situation, where only some weak acidic compounds were properly sampled by the experimental design. The studies in the literature involving pH as a factor are often deceiving, since they correspond to unrealistic situations, where the transition between the acidic and basic species can be fully observed. This rarely happens in real chromatography for samples containing several ionisable compounds.
- The optimisation strategy was based on the peak purity concept as chromatographic objective function. Peak purities were calculated from simulated chromatograms, predicted with the assistance of the mechanistic retention model, using local linear models for predicting peak asymmetries and efficiencies. This optimisation strategy was able to find the most suitable experimental conditions yielding full resolution in reasonable analysis times.

- The individual limiting peak purities for the probe compounds reached the maximal value,  $p_{\text{lim},i} = 1$  (with residual overlaps below  $10^{-8}$ ). This means that all solutes could be fully separated from the others up to perfect baseline, at least at one mobile phase composition.
- In general, the most critical experimental factor was the pH. It showed the narrower purity features in accordance to its stronger elution strength. Only a few sharp maxima (i.e. features in the  $T/\phi/\text{pH}$  purity space with small projections in the pH axis) were observed, with a global optimal peak purity usually below  $P_{\text{opt}} = 0.9$ . The second critical factor was the acetonitrile content, whose projections were wider. Finally, temperature was the least problematic under the point of view of separation, since the rate of change in resolution was slower.
- The separation of the probe compounds was clearly favoured at low pH, especially below pH 4, and in a narrow intermediate region. In order to enhance the accuracy in the region of higher resolution, a more comprehensive scanning at low pH is advised.
- The effect of acetonitrile content was less predictable than the effect of temperature: poor resolution was achieved at the higher contents (i.e. above 40%), which is expected since a stronger elution strength forces co-elution. However, poor resolution was also observed in a wide intermediate region.
- The separation was improved at higher temperature in spite of the shorter retention times. Unfortunately, the instrument did not allow appreciably larger temperature domains than the ones assayed.
- Full resolution in reasonable analysis times was found only in narrow domains of the factor space. These regions would be difficult to find without the assistance of a rigorous computer-based approach. On the other hand, solving problems like the one shown in this work with combinations of only two factors can be risky, except if the third factor is fixed to an adequate level. The temperature was indeed a useful factor, although its impact in the instrument accessible range was smaller than that brought forth by the organic solvent content and pH.



- Prediction of the resolution was checked for two experimental conditions in the optimal regions. The agreement between predicted and experimental chromatograms was satisfactory, regarding to the elution order, retention times and resolution. However, in one of the checked experimental conditions (at pH = 4.12), five solutes showed  $\log K$  values close to the mobile phase pH. This explained, at least partially, the shifts of the peaks in the experimental chromatograms for the four most retained solutes with respect to the predicted times. The  $\log K$  value for piretanide virtually coincided with the mobile phase pH, and consequently, the prediction of its retention time was critical.

#### **C.4. Chromatographic behaviour of a Chromolith RP-18e column for $\beta$ -blockers**

##### ***C.4.1. Interpretive optimisation of organic solvent content and flow-rate***

- Theoretically, the retention factors ( $k$ ) are independent of the flow-rate. Consequently, the classical quadratic relationship between  $\log k$  and the solvent content (Eq. (7.1) in Chapter 7) is expected to predict the retention times at any combination of solvent content and flow-rate, by using an appropriate dead time marker. It would be, thus, possible to obtain the coefficients in Eq. (7.1) from runs carried out at fixed flow-rate, but also from runs at different organic solvent contents and flow-rates.
- The accuracy of the predictions with Eq. (7.1) was checked with a set of 10  $\beta$ -blockers used as probe compounds, separated with a Chromolith Performance RP-18e column. For the most retained  $\beta$ -blockers, the predictions at different flow-rate were not entirely satisfactory. The observed deviations could be, however, corrected by including an additional term in Eq. (7.1) that correlated linearly  $\log k$  with the flow-rate (Eq. (7.6)).
- Plots of the retention time *versus* the reciprocal of the flow-rate ( $t_R$  vs.  $1/F$ ) showed a linear trend ( $R > 0.9999$ ) for all probe compounds. Ideally, these lines should exhibit null intercepts and the slopes coincide with the retention time at  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . However, for the most retained compounds, the fitted straight-lines

exhibited significant intercepts, which correlated positively with their retention. These positive intercepts can be the reason for the retention times not to halve exactly when the flow-rates are doubled. The consequence is a bias: the retention factors for the most retained compounds depend on the flow-rate. In other words, the  $k$  versus flow-rate lines at constant acetonitrile content are sloped instead of being invariant (i.e. with null slope).

- Two approaches were used to determine the dead time: the detection of the first perturbation in the chromatograms and the peak maximum of a marker (uracil). In both cases, the dead time values were checked to be independent of the mobile phase composition, with relative standard deviations below 2%. However, the dead time was more properly measured with uracil, since the corresponding intercepts for the  $t_R$  vs.  $1/F$  plots were almost null.
- Approximately linear relationships were found between the peak half-widths and the retention times, with similar coefficients for peaks eluting at varying mobile phase composition and fixed flow-rate, or fixed mobile phase composition and varying flow-rate. This allowed a simple prediction of peak shape and resolution.
- When the flow-rate was increased at fixed mobile phase composition, peak distribution was maintained, but the relative peak widths increased (i.e. the efficiency was deteriorated). Thus, the resolution impoverished up to reach unsatisfactory values for closely eluting compounds.
- With six experimental conditions (i.e. data measured at three mobile phase compositions, each at two flow-rates), all coefficients in the retention model (Eq. (7.6)) can be obtained with enough accuracy. Another possibility is developing the model at low flow-rate (at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  with the data obtained at three or four mobile phase compositions), and carry out additional runs using the optimal mobile phase at another flow-rate, since the resolution features are closely parallel in the flow-rate direction.
- Whole resolution ( $P_{\max} = 0.99$ ) for a set of nine  $\beta$ -blockers was predicted in a wide central region in the experimental design, which was narrowed at increasing flow-rate, due to overlapping of the two early eluting compounds. This progressive overlapping can be explained by the reduction in efficiencies at higher flow-rates.

- The accuracy in the predictions was demonstrated by comparing the experimental and predicted chromatograms for a mixture of  $\beta$ -blockers eluted at 13.3% acetonitrile and flow-rates of 1 and 5 ml min<sup>-1</sup>, and using an experimental condition out of the experimental design (6 ml min<sup>-1</sup>). The agreement was highly satisfactory in all cases.

#### ***C.4.2. Comparison of Chromolith RP-18e with microparticulate columns***

- The chromatographic performance of a silica-based monolithic column (Chromolith Performance RP-18e) was comprehensively compared with the performance of three microparticulate reversed-phase columns, manufactured with different types of silica: Spherisorb ODS-2 (type A), Kromasil C18 (type B) and XTerra MS C18 (type B combined with methylsilane). Type-A columns are more acidic than type-B ones, owing to the presence of isolated silanols and contaminating metals (e.g. Fe and Al) in the silica matrix.
- The study was carried out at 1 ml min<sup>-1</sup> with a mixture of nine/ten  $\beta$ -blockers, which are basic drugs. This feature allowed probing the silanol activity of each column. Analysis time, selectivity, peak shape (column efficiency and asymmetry), resolution capability and the possibility of transferring results between columns were considered in a wide range of mobile phase compositions. This contrasts with previous studies, which were performed at a single mobile phase composition.
- The Chromolith column offered favourable features with regard to the other columns in the analysis of  $\beta$ -blockers. This conclusion contrasts with previous comments on the inadequacy of Chromoliths to analyse basic compounds.
- The elution order of  $\beta$ -blockers was the same for the Chromolith, Kromasil and XTerra columns. Oxprenolol and labetalol changed their elution order with the Spherisorb column, and timolol gave rise to different elution orders with the different columns.

- Using acetonitrile-water mobile phases, the largest similarity in terms of analysis time and selectivity was found between the Chromolith and XTerra columns (except for 25% acetonitrile), the latter with better peak shape.
- The above results suggest that an appropriate transfer of the results to the Chromolith Performance RP-18e column is possible from the XTerra and Kromasil columns, especially for the former. The transference is possible in a wide range of mobile phase compositions.
- Peak half-widths of  $\beta$ -blockers were observed to correlate satisfactorily with the retention times. The larger slope for the right half-width indicates the tailing character of the compounds in all columns. The XTerra column yielded rather symmetric peaks. The strongest asymmetry corresponded to the Spherisorb and Chromolith columns.
- A mixture of nine  $\beta$ -blockers (timolol, which overlaps critically with acebutolol and metoprolol, was not included) exhibited good resolution in a wide range of compositions, with the Spherisorb column presenting the most critical situation, followed by the Kromasil column. The resolution was almost complete in the whole range of working conditions for the XTerra column. However, when the mixture included timolol, only the Chromolith column was able to resolve (and only partially) the critical peaks (timolol, acebutolol and metoprolol).
- With the Chromolith and Spherisorb columns, the addition of triethylamine (TEA) to the acetonitrile-water mixture yielded the following effects:
  - An important reduction in retention times for the Spherisorb column, whereas the change was minimal for the Chromolith column.
  - The elution order was the same for both columns, and different from that found in the absence of TEA.
  - An improvement in peak shape for both columns (Chromolith and Spherisorb), with the result that both the column efficiency and asymmetry became similar. This suggested a similar blocking effect of the silanol groups with TEA in both columns.
  - Similar selectivities for the Chromolith and Spherisorb columns in a large region of the experimental domains.

- In contrast to the other columns, both Chromolith and Spherisorb succeeded in the separation of the critical pairs at low acetonitrile content, being the analysis time somewhat shorter for the former column. The critical pairs could not be resolved for the X-Terra and Kromasil columns.

### C.5. Estimation of $\log P_{o/w}$ using a new chromatographic approach

- A previous study of the quantitative structure-property relationships (QSPR) demonstrated that the solute polarity, defined by means of a parameter  $p$  developed by Bosch *et al.* (Eq. (9.10) in Chapter 9), can be described by means of the combination of the logarithm of the octanol/water partition coefficient ( $\log P_{o/w}$ ) and four descriptors calculated from the solute structure: two electrostatic descriptors, a chemical-quantum descriptor and another that defines the possible hydrogen-bonding intermolecular interactions (Table 9.1).
- The estimation of  $\log P_{o/w}$  for solutes of different types using the polarity parameter  $p$  and the QSPR model previously described is here proposed (Eq. (9.17)). For this purpose, the solute retention data obtained for two columns (Luna C18 y Chromolith Performance RP-18) were obtained.
- In order to calculate  $\log P_{o/w}$ , the  $p$  values in the reference system (Spherisorb ODS-2 column and acetonitrile-water mobile phases) for which the QSPR model was established, are needed. With this purpose, it is interesting to indicate that the  $p$  values obtained in a given chromatographic system can be linearly correlated with those for another system. The coefficients for the transfer equations from the assayed chromatographic systems (Luna C18 and Chromolith, using acetonitrile and methanol as modifiers) to the reference system were established using sets of  $p$  values for 12 compounds selected in previous studies.
- The change in pH and  $pK_a$  values upon addition of acetonitrile or methanol to the aqueous buffer was taken into account, to assure that the solutes were neutral at the pH of the mobile phase. This was important, since the polarity model considers that the solutes are found as neutral species.

- For low retained compounds, small fluctuations in the dead time may affect the  $\log k$  value, and finally, the estimated  $\log P_{o/w}$ . This was especially critical for the acetonitrile-water mixtures.
- The plot of the estimated  $\log P_{o/w}$  *versus* reference values for the Luna C18 column showed that:
  - It allows the chromatographic measurement of polarity in a wide range, from highly hydrophilic (i.e.  $\log P_{o/w} < 0$ ) up to highly hydrophobic compounds (i.e.  $\log P_{o/w} = 6$ ).
  - The best results were obtained for acetonitrile in the 40–60% range. The number of compounds showing an anomalous behaviour (i.e. compounds showing differences between the estimated and reference  $\log P_{o/w}$  values  $> 0.6$ ) was larger for 60% acetonitrile. The anomalous compounds showed mostly low retention, and the calculation of their  $\log k$  was biased.
  - The scattering in the results was larger for methanol. The best correlations were obtained when working with 50–60% methanol.
- The plot of the estimated  $\log P_{o/w}$  *versus* the reference values for the Chromolith column showed that:
  - The possibility of working at higher flow-rate (in our case,  $2 \text{ ml min}^{-1}$ ) allowed the estimation of  $\log P_{o/w}$  for highly hydrophobic compounds up to  $\log P_{o/w} = 7$ . In contrast, this column was not adequate for highly hydrophilic compounds.
  - The best correlations corresponded to mobile phases with acetonitrile contents of 50–60%, with the disadvantage of finding a significant number of anomalous compounds, especially at 60% acetonitrile. The scattering of the results, once eliminated the anomalous data, was small and similar to the Luna C18 column, but it increased slightly at increasing acetonitrile contents in the mobile phase.
  - The scattering of the data with methanol was similar to that with acetonitrile. The best correlations corresponded to methanol contents in the 50–70% range, although the independent term was slightly below zero, giving rise to a small bias in the prediction of  $\log P_{o/w}$ .

- The proposed approach is based on the characterisation of solute polarity by means of a unique parameter  $p$ . The polarity model fits for most compounds with relatively simple structures, for which the parameter  $p$  does not depend on the mobile phase composition. However, there are compounds showing complex structures, for which the calculated  $p$  increase or decrease significantly with changes in the organic modifier content. For these compounds, a second parameter is required to take into account other interactions present in the column (e.g. hydrogen-bonding, Van der Waals or other intermolecular interactions). This is the reason for which these compounds give rise to anomalous estimated  $\log P_{o/w}$  for mobile phases with low or high organic modifier contents, although at intermediate contents the results are acceptable.
- Therefore, working at intermediate contents of organic modifier is preferable to avoid the effect of the linear changes (increase or decrease) in the polarity parameter  $p$  for some complex compounds. For highly hydrophilic compounds, working at low contents of organic modifier is advisable to avoid too low  $\log k$  values (i.e. with retention times close to the dead time).
- Better estimations were obtained with mobile phases of acetonitrile-water, considering both data scattering and the quality of the correlations. This coincides with previous comments published by Valkó *et al.* on the measurement of the polarity parameter CHI and its correlation with  $\log P_{o/w}$ , where the best results were obtained with acetonitrile.
- The proposed method does not make direct use of the chromatographic retention to estimate  $\log P_{o/w}$ , but rather takes into account properties related with chemical structures. It is an experimental method that can be used for compounds of new synthesis, for which there are no congeneric homologous of known polarity. It is also valid for a wide range of chromatographic systems.